

# 未熟卵胞の異種間移植による卵胞・卵子成熟機構に 関する基礎的研究

(研究課題番号：12671574)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金  
(基盤研究C (2)) 研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 千石 一 雄  
(旭川医科大学医学部助教授)

哺乳類動物の卵巣には数多くの卵子卵胞、一次卵胞などの未熟卵胞が存在しており、その保存ならびに *In vitro* または *In vivo* の発育が可能となれば、極めて有用性の高い生殖細胞の source となりうる。しかし、未熟卵胞の成熟・発育に関しては現在のところ未解明な点が多い。

## 未熟卵胞の異種間移植による卵胞・卵子成熟機構に関する基礎的研究

このためのマイクロカプセルを開発し、未熟卵胞を異種動物（ラット）へ移植すること、また、この異種間未熟卵胞移植の実験モデルから、初期卵胞の発育機構に関し、卵細胞からのシグナリングを中心に解明することを最終目的とするものである。

(研究課題番号：12671574)

### 研究組織

研究代表者：千石一雄（旭川医科大学医学部産科人科助教授）

研究期間：平成12年度～平成14年度科学研究費補助金  
(基盤研究C (2)) 研究成果報告書

### 交付決定額（配分額）

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
	平成15年3月		
平成12年度	1,200	0	1,200
平成13年度	1,000	0	1,000
平成14年度	1,000	0	1,000
総計	3,200	0	3,200

研究代表者 千石一雄  
(旭川医科大学医学部助教授)

哺乳類動物の卵巣には膨大な数の原始卵胞、一次卵胞などの未熟卵胞が存在しており、その保存ならびに In vitro, または In vivo の発育が可能となれば、極めて有用性の高い生殖細胞の source となりうる。しかし、未熟卵胞の成熟・発育に関しては現在のところ未解明な点が多い。

本研究は凍結保存融解後のマウス未熟卵胞（原始卵胞、一次卵胞）の異種間移植のためのマイクロカプセルを開発し、未熟卵胞を異種動物（ラット）へ移植し、成熟卵胞・卵子を獲得すること、また、この異種間未熟卵胞移植の実験モデルから、初期卵胞の発育機構に関し、卵細胞からのシグナリングを中心に解明することを最終目的とするものである。

#### 研究組織

研究代表者：千石一雄（旭川医科大学医学部産婦人科助教授）

研究分担者：田熊直之（旭川医科大学医学部産婦人科助手）

#### 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	1,200	0	1,200
平成13年度	1,000	0	1,000
平成14年度	1,000	0	1,000
総計	3,200	0	3,200

## 研究発表

### (1) 学会誌等

石川睦男、千石一雄、玉手健一、林博章、山下幸紀、川村光弘他7名：

産婦人科領域感染症における Cefpirome の臨床検討

産科と婦人科 67:111-118, 2000

千立志、玉手健一、千石一雄、石川睦男：

ラット黄体機能における Mn-SOD と NO の役割に関する検討

日本産婦人科学会誌 52: 1-10, 2000

T Miyamoto, H Hayashi, K Sengoku, H Ojima, Y Tokusashi, Y Yaginuma, N Takuma,  
S Hasuike, N Miyokawa, M ishikawa:

Diffuse malignant mesothelioma of the uterus

Acta Obstet Gynecol Scand 79:154-155, 2000

千石一雄：

生殖医療の現状と展望

北海道医学雑誌 75:237-242, 2000

K Sengoku, N Takuma, M Horikawa K Tsuchiya, H Kpmori, D Sharifa, K Tamate M  
Ishikawa:

Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and  
trophoblast outgrowth in vitro

Mol Reprod Dev 58: 262-268, 2001

千石一雄、石川睦男：

多量出血 I 妊娠初期、後期

産科と婦人科 71: 497-503, 2001

千石一雄、田熊直之、石川睦男：

生殖医療の基礎と臨床一卵細胞膜と精子の相互作用

産婦人科世界 Sup 1:169-174 , 2001

千石一雄:

卵細胞膜と精子の相互作用—ヒト卵細胞膜多精子受精防御機構の解析の視点から—

日本産婦人科学会誌 53: 1586-1595, 2001

S. Dinara, K. Sengoku, K.Tamate, M.Horikawa M. Ishikawa :

Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes

Human Reproduction 16: 1976-1981, 2001

小森春美、碁石勝利、玉手健一、千石一雄、石川睦男、中根宏、飯塚一、土屋晶子、荒木啓光 :

更年期女性における保湿・保護化粧品 KY97C1 の有用性に関する研究

日本更年期学会誌 9: 238246, 2001

M. Ishikawa, K.Sengoku, K. Tamate, Y.Takaoka, M. Kane, P.F.Fottrell:

The clinical usefulness of salivary progesterone measurement for the evaluation of the corpus luteum function

Gynecolo Obstet Invest 53: 32-37 , 2002

K.Tsuchiya, Y. Kamiguchi, K. Sengoku. M. Ishikawa

A cytogenetic study of in-vitro matured murine oocytes after ICSI by human sperm

Human Reproduction 17: 2, 420-425, 2002

千石一雄、石川睦男:

産婦人科手術における合併症管理のすべて—帝王切開術

臨床婦人科産科 56: 4, 465-469, 2002

B. Pan K. Sengoku, K Goishi, N. Takuma, T Yamashita, K Wada, M. Ishikawa :

The soluble and membrane-anchored forms of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor appear to play opposing roles in the survival and apoptosis of human

luteinized granulose cells

Mol Hum Reprod 8: 8, 734-741, 2002

千石一雄、石川睦男:

卵子と精子の相互作用

産科と婦人科 69:10, 1291-1295, 2002

T. Miyamoto, K. Sengoku, N. Takuma, S. Hasuike, H. Hayashi, T. Yamauchi, T. Yamashita, M. Ishikawa:

Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, STRA8, stimulated by retinoic acid gene 8

J Assist Reprod Genet 19:11, 531-535, 2002

N. Takuma, K. Sengoku, B. Pan, K. Wada, T. Yamauchi, T. Miyamoto, D. Ohsumi, M. Ishikawa :

Laparoscopic treatment of endometrioma-associated infertility and pregnancy outcome

Gynecol Obstet Invest 54: (suppl 1), 30-35, 2002

石川睦男、千石一雄:

婦人科疾患の診断・治療・管理—乳汁漏出性無月経

日本産婦人科学会誌 54 : 12、565-571, 2002

## (2) 口頭発表

田熊直之、千石一雄、堀川道晴、小森春美、槌谷恵子、石川睦男

「下垂体の初期発生に関する分子遺伝学的検討」

第52回日本産科婦人科学会 4月3日、2000 (徳島)

水上明保、玉手健一、千石一雄、石川睦男

「ヒト卵巣組織のヌードマウスへの異種間移植の試み」

第52回日本産科婦人科学会 4月3日、2000 (徳島)

槌谷恵子、千石一雄、田熊直之、堀川道晴、小森春美、渡邊行朗、石川睦男  
[マウス体外成熟卵 ICSI の安全性に関する細胞遺伝学的検討]  
第52回日本産科婦人科学会 4月3日、2000(徳島)

柳沼裕二、林博章、山下剛、森麴 夕裕二、林博章、山下剛、森喉山下剛、森  
崎篤、石谷敬之、加藤育民、千石一雄、石川睦男  
[子宮癌における PTEN 遺伝子の解析と PTEN 遺伝子産物と相互作用する  
遺伝子の同定]  
第52回日本産科婦人科学会 4月4日、2000(徳島)

山下剛、市川英俊、加藤育民、石谷敬之、田熊直之、柳沼裕二、林博章、千石  
一雄、石川睦男  
[子宮内膜症におけるダイオキシン類代謝酵素 CYP1A1 多型の解析]  
第52回日本産科婦人科学会 4月4日、2000(徳島)

千石一雄、玉手健一、石川睦男  
[唾液中プロゲステロン測定による黄体機能の評価一連日測定による正常基準  
値設定の検討]  
第52回日本産科婦人科学会 4月4日、2000(徳島)

B. Pan, K. Goishi, K. Tamate, K. Sengoku, M. Ishikawa  
[Expression of heparin-binding epidermal growth factor in rat ovarian follicles and  
corpora lutea]  
第52回日本産科婦人科学会 4月4日、2000(徳島)

槌谷恵子、小森春美、堀川道晴、田熊直之、千石一雄、石川睦男  
[体外成熟卵子の細胞遺伝学的検討]  
第41回日本哺乳動物卵子学会 6月2日、2000(網走)

K. Sengoku, K. Tamate, N. Takuma, M. Horikawa, H. Komori, K. Tsuchiya, M.  
Ishikawa  
[The clinical usefulness of salivary progesterone measurement for evaluation of the

corpus luteum function]

第 16 回欧州生殖会議 2000. 7.26 (ボローニャ)

N.Takuma, K.Sengoku, S.Kimura, M.Horikawa, H.Komori, K.Tsuchiya M.Ishikawa  
[T/ebp is the essential gene for pituitary morphogenesis during mouse embryogenesis]

第 16 回欧州生殖会議 2000. 7.26 (ボローニャ)

田熊直之、千石一雄、小森春美、槌谷恵子、石川睦男

[マウス胚の神経外胚葉に発現する NKX2 遺伝子は分泌因子 Shh シグナルに依存的である]

第 45 回日本不妊学会 11 月 23・2000 (神戸)

千石一雄

シンポジウム 1 受精機構とその異常

「卵細胞膜と精子の相互作用— ヒト卵細胞膜多精子受精防御機構の解析の視点から」

第 53 回日本産科婦人科学会 5 月 13 日、2001 (札幌)

田熊直之、千石一雄、槌谷恵子、小森春美、渡辺行朗、石川睦男

[ヒト卵における CD9 の役割]

第 53 回日本産科婦人科学会 5 月 14 日、2001 (札幌)

槌谷恵子、千石一雄、田熊直之、小森春美、渡辺行朗、石川睦男

[ICSI 施行時における卵の穿刺部位の限定は必要か]

第 53 回日本産科婦人科学会 5 月 14 日、2001 (札幌)

千石一雄、渡辺行朗、槌谷恵子、小森春美、田熊直之、石川睦男

[一酸化窒素 (NO) のマウス卵子成熟、初期胚発育、着床におよぼす影響]

第 53 回日本産科婦人科学会 5 月 14 日、2001 (札幌)

石郷岡哲郎、上村淳一、市川英俊、伊藤秀行、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[前置胎盤に合併する癒着胎盤症例の治療法に関する検討]



第 53 回日本産科婦人科学会 5月14日、2001 (札幌)

伊藤秀行、上村淳一、渡邊行朗、市川英俊、石郷岡哲郎、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[ART を含む不妊治療後妊娠におけるインフォームドコンセントの重要性に対する検討 — 双胎妊娠を中心として —]

第 53 回日本産科婦人科学会 5月14日、2001 (札幌)

B. Pan, K. Sengoku, N. Takuma, K. Tsuchiya, H. Komori, Y. Watanabe, M. Ishikawa

[Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor is an Autocrine Growth Factor Essential for the Survival of Human Luteinized Granulosa Cells]

第 53 回日本産科婦人科学会 5月14日、2001 (札幌)

和田恵子、千石一雄、田熊直之、石川睦男

[ICSI 施行時における卵の穿刺部位の特定は必用か]

第 19 回日本受精着床学会 2001.7.13 (徳島)

田熊直之、千石一雄、和田恵子、石川睦男

「マウス卵子凍結保存におよぼすフリーラジカルの影響」

第 46 回日本不妊学会 11月8日、2001 (東京)

Takuma N, Sengoku K, Wada K, Ishikawa M, Takeuchi A, Miyakawa H, Sugimura K, Ishikawa M

[The role of CD9 in human oocyte plasma membrane polyspermy block]

第 17 回世界不妊学会 11月26日、2001 (メルボルン)

山内智文、千石一雄、和田恵子、田熊直之、石川睦男

[マウス未受精卵凍結保存におけるフリーラジカルスカベンジャーの有用性に関する検討]

第 54 回日本産科婦人科学会 2002, 4.8 (東京)

大隅大介、上村淳一、神藤巳佳、片山英人、石郷岡哲郎、  
福家信二、千石一雄、石川睦男

[HELLP症候群とTTPを発症したSLE合併妊娠の一例と当科における  
SLE合併妊娠例の検討]

第54回日本産科婦人科学会 2000, 4.8 (東京)

田熊直之、千石一雄、和田恵子、山内智文、石川睦男

[ヒト卵細胞膜と精子の結合・融合におけるインテグリンの役割]

第54回日本産科婦人科学会 2000, 4.8 (東京)

藩 伯臣、千石一雄、田熊直之、和田恵子、小森春美、石川睦男

[ヒト黄体細胞におけるHB-EGF及びその受容体の発現と生理作用]

第54回日本産科婦人科学会 2000, 4.8 (東京)

福家信二、神藤巳佳、石郷岡哲郎、上村淳一、宮川博栄、土田 充、千石一雄、  
石川睦男、伊藤秀行 [3次元立体画像を用いた胎児心臓超音波検査により両  
大血管右室起始 (Taussing-Bing 奇形)、大動脈縮窄症と出生前診断できた1例]  
第54回日本産科婦人科学会 2000, 4.8 (東京)

田熊直之、千石一雄、和田恵子、藩 伯臣、堀川道晴、山下 剛、山内智文、  
宮本敏伸、石川睦男

[Laparoscopic treatment of endometriosis and infertility outcome]

第5回 Japan Conference on Endometriosis 5月16日、2002 (神奈川・箱根)

石谷敬之、杉村和代、横浜祐子、荻野元子、片山英人、山下 剛、藤井哲哉、  
千石一雄、石川睦男、林博章、上村淳一

[婦人科良性疾患に対する腹腔鏡下手術時に抗菌薬の予防投与は必要か?]

第20回日本産婦人科感染症研究会 6月29日、2002 (東京)

千石一雄

特別講演『生殖医療の最前線』

第82回北海道医学大会総会 9月28日、2002 (札幌)

宮本敏伸、千石一雄、田熊直之、石川睦男

[ヒト RNH2 および STRA8 遺伝子の単離およびその発現様式の解析]  
第 47 回日本不妊学会 10月4日、2002 (岐阜)

(3) 出版物

千石一雄、石郷岡哲朗：

産婦人科、泌尿器科、体表臓器およびその他の領域  
健全胎児と形態の異常—泌尿生殖器

新超音波医学 4 医学書院 77-80 2000

石川睦男、千石一雄：

性腺機能低下症

内分泌疾患診療マニュアル 日本医師会雑誌 127:12,S284-285, 2002

## 研究成果

### 1 研究目的

本研究はヒト未熟卵胞の凍結保存法の確立、凍結融解後の未熟卵胞(原始卵胞、一次卵胞)の体外培養系の確立のための第一段階として、凍結保存融解後のマウス未熟卵胞(原始卵胞、一次卵胞)の異種間移植のためのマイクロカプセルを開発し、未熟卵胞を異種動物(ラット)へ移植し、成熟卵胞・卵子を獲得することを目的とする。また、この異種間未熟卵胞移植の実験モデルから、初期卵胞の発育機構に関し、卵細胞からのシグナリングを中心に解明するものである。

### 2.研究成績

- (1) 異種間移植のための未熟卵胞の凍結保存、マイクロカプセルの開発に関する基礎的研究

#### 研究目的

マウス卵巣を酵素処理し得られる初期卵胞の至適凍結保存法に関し検討するとともに、凍結融解後の卵胞の移植のための至適なマイクロカプセルの開発を目的として、アルギンビーズ法、アガロースマイクロカプセル、アガロース/ポリスチレン/スルホン酸の三層性アガロースカプセル、polyvinyl alcohol hydrogelカプセルの有用性に関し比較検討する。基礎実験としてヌードマウスを用い、腹腔内移植、卵巣嚢内移植、皮下移植の比較検討から至適移植部位を明らかにする。その後、異種間移植(ラット)後の卵胞発育促進のための至適ゴナドトロピン、成長因子の投与方法に関し検討する。また、各種成熟段階の卵胞のGDF9, C-kit, SCF, FAK, FLT3, C-fmsの発現の検討から初期卵胞発育機構の一端を解明することを目的とする。

#### 研究方法

B2D6F1 マウスを用い、卵巣をコラゲナーゼ、DNAエースで処理し、原始卵胞、卵胞腔形成前の1次卵胞を採取し、我々が考案したマウス未受精卵の凍結保存法(1.5 M propandiol, 0.2 M sucrose を耐凍剤とした5 step dilution法)を用い、

緩徐凍結プログラミングにより凍結保存後、生存率を propidium Iodide と carboxyfluorescein 蛍光色素による double staining 法により検討した。凍結未熟卵胞を融解後、塩化アルギンビーズ、アガロースマイクロカプセル、アガロース/ポリスチレン/スルホン酸を用いた三層性アガロースカプセルまたは polyvinyl alcohol hydrogel を応用したマイクロカプセルを用い、In vitro 培養系での生存率、性ステロイド (E2, P4) 産生能の比較検討した。

未熟卵胞を充填したマイクロカプセルをヌードマウス腹腔内、卵巣嚢内または皮下に移植し、移植後の生着率、生存率・卵胞の発育率に関し検討した。また、ラットを用いて、マイクロカプセル化した原始卵胞をヌードマウスで検討した至適移植部位に移植し、免疫抑制剤投与群と非投与群との生着率・生存率・卵胞発育率を検討した。

卵胞内卵子および卵胞細胞からグアニジウムチオシアネイト法により total RNA を抽出し逆転写酵素により一本鎖 cDNA を合成し、その後 GDF-9, C-kit, SCF のプライマーを設定し、35回の polymerase chain reaction を行いアガロースゲルを用いて電気泳動を行い GDF-9, C-kit, SCF mRNA の発現を検討した。

## 研究成績

- 1) 未熟卵胞の凍結条件に関しては、1.5 M propandiol, 0.2 M sucrose を耐凍剤とした 5 step dilution 緩徐凍結法により 60% 程度の生存率が得られた。さらに、凍結融解時に NO 除去剤 (ヘモグロビン) および活性酸素除去酵素 (SOD) を同時添加することにより有意に高率な生存率が得られた。
- 2) マイクロカプセルの素材の比較検討では塩化アルギンビーズ、アガロース、三層性アガロースカプセルとも in vitro での培養実験では生存率に差は認められず、また、ステロイド産生は確認できなかった。
- 3) ニードマウスを用いた移植部位の比較では腹腔内、卵巣嚢内いずれの部位においても卵胞の生着、発育を認めることを確認した、しかし、卵胞腔形成迄の発育を認めたが、成熟卵胞迄の発育は認められなかった。さらに、FSH は濃度依存性に卵胞発育を促進したが、EGF の効果は確認されなかった。また、ラットへの異種間移植ではマイクロカプセルを用いても卵胞の発育は確認されなかった。
- 4) 1次卵胞、2次卵胞において GDF-9, C-kit の発現を real time PCR 法により確認した。

## 考察

緩徐凍結法により未熟卵胞の凍結保存の可能性が示唆され、NO および活性酸素の除去が凍結融解後の生存率の向上に寄与することが示唆された。また、マイクロカプセルを用いた未熟卵胞の体外成熟、同種間移植による卵胞の成熟が確認されたが、異種間移植には成功しておらず、今後、免疫抑制剤の検討、マイクロカプセルの改良など、さらなる検討の必要性が示された。一方、卵胞発育に関するシグナリングに関する検討において未熟卵子に GDF-9, C-kit の mRNA を確認したが、今後、FAK, FLT3, c-fms を含め定量的検討が必要であると考えられた。

## (2) フリーラジカルスカベンジャーのマウス未受精卵凍結保存に及ぼす影響

未熟卵胞の凍結保存の確立を最終目的として、その前段階として未受精卵の効率的な凍結保存法の確立のため、凍結融解過程で発生する各種のフリーラジカルの影響に関し基礎的研究を行った。

## 研究目的

ヒト受精卵の凍結保存はすでに臨床応用が進んでいるが、所有権の問題また、悪性腫瘍を有する若年婦人の妊孕性の温存などの観点から、卵子凍結保存法の確立が期待される。

しかし、現在のところ、卵子凍結融解後の生存率・受精率は低値である。精子では凍結保存時に発生する活性酸素・一酸化窒素(NO)などのフリーラジカルが精子細胞膜の機能障害、DNA障害をもたらし、融解後の生存率低下の一因となることが報告されている。本研究では卵子の凍結・融解時に発生する各種のフリーラジカルが融解後の卵子生存率低下の要因になっているか否かを検討する目的で、マウス卵の凍結・融解時にフリーラジカルスカベンジャーを添加し、その有効性に関し検討した。

## 研究方法

過排卵処理して得られたマウス未受精卵を最終濃度0.1M sucrose, 1.5M propanediolにて5段階で緩慢凍結にて凍結保存、急速融解を行った。凍結およ

び融解時に各種濃度のNO発生剤 (SNP)、NOS阻害剤 (L-NAME)、NO消去剤 (ヘモグロビン: Hb) および活性酸素消去酵素(SOD), catalaseを添加し融解後の生存率、受精率に関し検討した。

## 研究成績

### 1) カタラーゼ、SOD添加の影響

凍結融解時のカタラーゼ添加(10-1000 IU/ml)は融解後の卵子生存率および受精率に影響を及ぼさなかった。一方、50 IU/ml の濃度のSOD添加により生存率、受精率は各々53.2%、28.4%と対照群の37.8%、14.3%に比し有意な上昇を認めた。また、10 IU/ml のカタラーゼ、50 IU/ml SOD添加により高率な受精率が得られた。

### 2) 一酸化窒素 (NO) の影響

高濃度 ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M) のNO供与剤(SNP)の添加により生存率、受精率は低下した。一方、 $10^{-7}$  M L-NAME (NOS阻害剤) 添加により、生存率、受精率の上昇が認められたが、高濃度のL-NAME の添加は逆に用量依存性に生存率、受精率の低下をもたらした。0.1  $\mu$ gおよび1  $\mu$ gの NO消去剤(Hb)の添加により生存率、受精率は向上したが、これより低濃度、高濃度のHb添加は影響を与えなかった。

### 3) SODとHbの同時添加の影響

0.1  $\mu$ g Hbおよび50 IU/ml SODの同時添加により最も高率な生存率 (70.6%)、受精率 (51.7%) が得られた。

## 考察

SOD添加が凍結融解後の生存率、受精率を改善する結果より、SODの添加による凍結融解時に発生する活性酸素の消去が、卵子の凍結障害に保護的に作用することが明らかとなった。また、高濃度のSOD添加により生存率が低下する現象が認められたことは、高濃度のSOD添加により発生する過剰な $H_2O_2$ が卵子の機能障害を引き起こした結果であり、卵子の生存には、酸化、還元システムのバランスが重要であると考えられる。

一方、高濃度のSNP、L-NAMEの添加は卵子の生存率を低下させ、低濃度のL-NAMEが融解後の生存率を向上させる結果より、凍結融解時にNOが産生され、同様に発生する活性酸素との相互作用により産生される毒性の強いパーオキシナイトライトが卵子凍結時の細胞障害の一因となることが示唆され、これらの

フリーラジカルの除去により生存率が上昇したものと推測される。特に、HbとSODの同時添加により最も高率な生存率、受精率が得られたことは、活性酸素と一酸化窒素の相互作用が卵子の凍結障害の主要な要因となることを確認するものである。これらの結果より、卵子の凍結障害の原因としては凍結融解時に発生するフリーラジカルが卵細胞膜脂質の過酸化を誘起し、それにより細胞膜の機能障害、DNA障害が惹起され、最終的に卵子がアポトーシスを起こすものと推定される。

したがって、未熟卵胞の凍結保存に関しても、これらのフリーラジカルの関与が推測され、至適な凍結保存法の確立には、フリーラジカルの除去が重要である可能性が示唆される。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料1)

Effects of supplementasion with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes.

Human Reproduction 16: 9; 1976-1981, 2001

### (3) 体外成熟マウス卵の卵細胞質内精子注入(ICSI)後の細胞遺伝学的検討

未成熟卵子の凍結保存により透明帯の硬化が惹起され、その結果、体外受精時に精子の侵入が阻害され受精率が低下することが報告されている。未熟卵胞の凍結融解後にもこの現象が起きることは十分に予想されることであり、受精卵を得るには顕微授精が必須な方法となる。しかし、現在のところ体外成熟卵の顕微授精により得られた受精卵の細胞遺伝学的検討は十分に行われておらず、細胞遺伝学的安全性が確立していない。本研究は体外成熟および顕微授精法の卵子染色体への影響を検討することにより、その安全性を明らかにすることを目的とした。

#### 研究目的

ヒト卵は第一成熟分裂完了後に受精能を得るが、体外受精を目的とした過排卵処理後では受精能を持たない未熟卵の混在をしばしば経験する。未熟卵を体外培養により成熟させ、顕微授精(卵細胞質内精子注入 intracytoplasmic sperm



injection 以下 ICSI) にて受精卵を得る試みは妊娠率の向上につながると期待されるが、これらの手技により得られた受精卵の安全性について検討した報告は認められない。新しい生殖補助技術の導入に際し、その次世代への影響は必ず検討されるべき課題であり、本研究ではマウスの未熟卵を用いて、体外培養による成熟卵、及び体外成熟後に ICSI を施行した卵子の染色体分析により細胞遺伝学的正常性に関し検討を行った。

## 研究方法

### 1) マウス卵の体内成熟卵子、および体外成熟卵子の採取法

3-5 週齢の B6D2F1 マウスに 5IU PMSG を腹腔内投与し、48 時間後に卵巣の発育卵胞から採取した卵子を human tubal fluid (HTF) 液中で 18 時間体外培養して成熟させた (in vitro maturation、以下 IVM)。同様に PMSG 投与 48 時間後に 5IU HCG を腹腔内投与し、さらに 16 時間後に卵管より体内成熟過排卵卵子を採取した。倒立顕微鏡下で卵の発達段階を germinal vesicle (GV) 期、metaphase I (M I) 期、metaphase II (M II) 期に分類した。

### 2) ヒト凍結解凍精子を用いた異種間顕微授精法

受精後、卵子由来と精子由来の染色体を各々分析するため、ヒト精子対マウス卵子間の異種間顕微授精を施行した。Informed consent を得て回収したヒト精子に TEST yolk buffer を加え、液体窒素内で凍結保存し、使用時に適宜解凍した。体内成熟、体外成熟の両実験群から M II 期の卵を選別し、piezo-electric pipette-driving unit を用いて顕微鏡下で凍結解凍精子を卵細胞質内に注入した。ICSI 後卵を CZB 液中に移し、細胞分裂阻害であるピンプラスチンを添加した後、第 1 卵割中期まで培養した。

### 3) 染色体標本作製、染色体分析法

卵の透明帯をアクチナーゼ処理にて除去し、卵に低張処理を施した後、漸進固定空気乾燥法にて染色体標本作製した。標本に通常のギムザ染色および C-バンド法にて分染動原体染色を施し、染色体異常の有無を判定した。体外成熟の有無、顕微授精の有無により、排卵卵子 (体内成熟 M II 期卵) を control/M II 群、体外成熟 M II 期卵を IVM/M II 群、排卵卵子に ICSI を施行した群を control/ICSI 群、体外成熟卵子に ICSI を施行した群を IVM/ICSI 群とし、比較した。

## 研究成績

### 1) 卵の体外成熟率および体内成熟率

各群の成熟率は control/M II 群 93.4% (157/168)、IVM/M II 群 52.1% (134/257)、control/ICSI 群 93.4% (457/476)、IVM/ICSI 群 59.9% (1335/2228) の値を示した。すなわち IVM 群では control 群に比し有意に成熟率が低かった。(p<0.01)

### 2) ICSI 卵の活性化率、前核形成率

ICSI 施行群における活性化率と前核形成率は各々、control/ICSI 群 97.2% (141/145)、82.8% (120/145)、IVM/ICSI 群 69.9% (188/269)、59.5% (160/269) となり、いずれも体外成熟群が有意に低かった。しかし、活性化した卵における受精率と比較するとその後の前核形成率には有意名差を認めなかった。(85.1% vs 85.1%)

### 3) ICSI 卵の細胞学的検討

ICSI 施行群の非活性化卵および、活性化した後雄性前核形成前に発生が停止した卵では膨化精子頭部が高率に認められた (control/ICSI 群 31.2% ; IVM/ICSI 群 60.0%)。また、IVM/ICSI 群でのみ、premature chromosome condensation (以下 PCC) が 28.4% に認められた。

### 4) 細胞遺伝学的検討

#### 4-1) 卵子由来の染色体異常

各群の倍数性異常率は control/M II 群 0% (0/120)、IVM/M II 群 0.9% (1/110)、control/ICSI 群 8.0% (9/112)、IVM/ICSI 群 12.6% (13/103) となり、ICSI 施行群では ICSI 未施行群に比し有意に高値を示した (p<0.01) が、体外成熟の有無による差は認められなかった。異数性異常 (control M II 群 0.8%、IVM/M II 群 0.9%、control/ICSI 群 3.6%、IVM/ICSI 群 2.9%)、構造的異常 (control M II 群 0%、IVM/M II 群 0%、control/ICSI 群 0%、IVM/ICSI 群 2.0%) にも各群間で有意差は認められなかった。

#### 4-2) 精子染色体

異数性異常 (control/ICSI 群 6.8%、IVM/ICSI 群 2.4%)、倍数性異常 (control/ICSI 群 0%、IVM/ICSI 群 0%)、構造的異常 (control/ICSI 群 3.4%、IVM/ICSI 群 3.6%) のいずれにおいても各群間で有意差は認められなかった。

## 考察

本研究では、体外培養により得られた成熟卵は体内成熟卵に比し ICSI 後の活性化率、前核形成率が有意に低いという結果が得られた。Control/ICSI 群で活性化を認めなかった 4 卵すべてが精子成分を欠いており、体内成熟卵では確実に精子が卵細胞質内に注入されることにより、ほとんどすべての卵で活性化が起こることが示唆された。一方、IVM/ICSI 群では非活性化卵 81 のうち、51 卵に精子成分を認め、非活性化の原因として、卵の未熟性に起因する、精子からの卵活性化シグナルに対する反応性の欠如が考えられた。PCC は、精子核が精子脱凝縮因子によって活性化されても、sperm factor によって誘起される活性化に卵が反応しない場合に誘導される現象ととらえられているが、PCC と卵子の未熟性が相関することが報告されている。本研究で PCC は IVM/ICSI 群でのみ観察され、また、精子の進入にも関わらず卵活性化率が低値であったことから、体外成熟卵は、形態的には核成熟を完了していても、細胞質の成熟は不完全であるという結果を得た。

ICSI を施行した群では体外成熟の有無に関係なく高率に膨化精子頭部がみられ、この段階での発生停止が ICSI 後の胚発生停止の最大の原因であると考えられた。この事象はヒト卵でも観察され、ヒト未受精卵の解析では通常の外受精に比し ICSI 後に有意に高い頻度で認められるという報告があり、膨化精子期の発生停止が ICSI の手技自体により誘導される可能性が示唆された。

ICSI 施行群で約 10% の倍数性異常が認められたが、今回の実験ではヒトとマウスの染色体が判別可能であったため、倍数性異常の余剰ゲノムすべてが卵子由来であることが染色体核型の違いとしてはっきり確認された。ヒト ICSI 後に認められる三前核の主原因が、精子由来ではなく卵子の第二極体放出不全であろうという諸家の仮説は、今回の結果により初めて細胞遺伝学的に証明された。

また、マウスの体外成熟 M II 期卵の異数性異常率が 15% であったという既存の報告があるが、我々のデータ (IVM/M II 群の異数性異常率 0.9%) との差違の原因として、マウスの系統、過排卵処理の有無、培養液、標本固定法の相違等が考えられる。さらにその報告では体内成熟卵との比較がおこなわれておらず、体外成熟と染色体異常との因果関係は明白ではない。我々の結果では、control/M II 群と IVM/M II 群間、また、control/ICSI 群と IVM/ICSI 群間で有意差は認められず、体外成熟そのものが染色体異常を増加させるという考えには

否定的な結論となった。また、ICSI 施行群と非施行群間に異数性異常率および構造的異常率に有意差が認められないことより、今後 IVM/ICSI は、新しい生殖補助技術のひとつとして、その臨床応用にますます期待がかかることになろう。

本研究は体外成熟後の顕微授精により得られる受精卵が、体内成熟後の顕微授精により得られる受精卵と同等の染色体正常性を有することを明らかにし、成熟卵の採卵が困難な不妊婦人の治療法としての安全性を示唆するだけでなく、若年卵巣悪性腫瘍患者の oocyte banking 構想に重要な情報を提供するものである。さらに、未熟卵胞凍結保存後に得られた受精卵の正常性を推測させるものである。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料2)

A cytogenetic study of in-vitro matured murine oocytes after ICSI by human sperm  
Human Reproduction 17:2; 420-425, 2002

#### (4) ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子 (HB-EGF) のヒト黄体化顆粒膜細胞の生存及びアポトーシス調節機構に関する研究

近年 HB-EGF が卵胞発育、初期胚発育、着床など生殖生理に深く関与していることが明らかにされつつあり、我々もこれ迄 HB-EGF が卵子の成熟および初期胚発育に促進的作用を有することを明らかにしてきた。一方、未熟卵胞、卵子の発育、成熟には多くの局所因子が関与することも報告されている。今回、未熟卵胞、卵子の発育、成熟におよぼす局所因子の作用に関し検討するため、HB-EGF に着目し、HB-EGF のヒト黄体化顆粒膜細胞における役割に関し基礎的研究を行った。

#### 研究目的

黄体は妊娠成立と妊娠の維持に極めて重要な役割を有しているが、その発育、退行機構は十分に解明されていない。一方、ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子(Heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)は EGF family の新しいメンバーで、膜アンカー型の前駆体 (proHB-EGF) と、

ectodomain shedding により前駆体より切断された溶解型 (sHB-EGF) の成熟 HB-EGF として存在する。sHB-EGF は paracrine 作用により細胞の生存と増殖を促進し、一方、proHB-EGF は juxtacrine 作用により細胞に多才な機能をもたらすことが知られている。しかし、黄体細胞における HB-EGF の発現および生理作用に関しては未だ解明されていない。本研究では HB-EGF およびその受容体の黄体細胞における発現、ならびに黄体細胞の増殖、アポトーシス調節機構に関する proHB-EGF, sHB-EGF の役割に関し検討した。

## 研究方法

1. 材料：インフォームドコンセントを得たうえで、体外受精胚移植 (IVF-ET) 時に卵胞より採取した黄体化顆粒膜細胞 (Luteinized granulosa cells, LGC) を Ficoll-Paque を用い遠心分離後、10%血清添加 RPMI1641 培地で 48 時間培養した。
2. mRNA の測定：HB-EGF の受容体である HER1 と HER4 および他の EGF 受容体 family メンバーである HER2, HER3 の LGC における mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。また、sHB-EGF の添加による HB-EGF mRNA 発現量の変化は real-time PCR 法で測定し、RT-PCR 産物は sequencing 法で確認した。
3. 免疫組織化学法：Vector Laboratories, Inc の ABC-P0 kit を用い、AEC 染色により HB-EGF と HER4 の蛋白発現を免疫組織化学法で検討した。
4. アポトーシスの判定：48 時間培養後の LGC を無血清培地に移した後、sHB-EGF である recombinant HB-EGF および HB-EGF と HB-EGF 受容体 (HER1) の相互作用阻害剤である CRM197 を添加し、24 時間培養後のアポトーシス発現頻度を検討した。アポトーシスの判定には、細胞質内の lipid droplet を検出できる Oil red 法を改良して、LGC の特定と同時に細胞のアポトーシスを観察した。また、TUNEL 法 (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP-FITC nick end labelling) を用い、アポトーシス細胞の確認を行った。

## 研究成績

1. HB-EGF の発現：LGC の HB-EGF mRNA 発現量は 10 ng/ml sHB-EGF の

刺激により短時間で上昇を認め、その発現レベルは添加2時間でコントロールに比し2.5倍に上昇し( $p<0.01$ )、その後漸減し、24時間で刺激前値にまで減少した。また、免疫染色では細胞周囲とくに細胞間の interphase が強く染色されたことより、この HB-EGF は膜アンカー型の pro-HB-EGF であることが示唆された。

2. HB-EGF 受容体の発現:RT-PCR 法により LGC において EGF 受容体 family のメンバーである HER1, HER2, HER3, HER4 の全ての発現が認められた。また、免疫組織化学法では HER4 受容体は膜表面ではなく、細胞核内に強い発現を認めた (nuclear translocation)。
3. LGC における sHB-EGF の作用:LGC の無血清培地培養下における sHB-EGF 添加実験では、24 時間後のコントロールでは細胞の分裂が認められなかったのに対し、sHB-EGF 添加群では分裂像が認められた。単一細胞のアポトーシス発生率はコントロールで  $38\pm 7.3\%$  を示したのに対し、10ng/ml および 100ng/ml sHB-EGF 添加群では各々  $28.2\pm 1.9\%$ 、 $23.0\pm 2.1\%$  ( $p<0.05$ ) と用量依存性にアポトーシスが抑制された。重層細胞においても、アポトーシス発生率はコントロールの  $39.2\pm 6.1\%$  にたいして sHB-EGF 10ng/ml, 100ng/ml 添加により  $25.2\pm 4.1\%$ 、 $18.2\pm 2.1\%$  ( $p<0.01$ ) と用量依存性に抑制された。
4. LGC における CRM197 の作用:HB-EGF と HER1 の結合阻害剤である CRM 1g/ml, 10g/ml 添加 24 時間後の LGC のアポトーシス発生率は単一細胞ではコントロール  $40.1\pm 8.6\%$  に対して各々  $36.2\pm 9.7\%$ 、 $28.7\pm 7.0\%$  ( $p<0.05$ )、重層細胞ではコントロール  $37.8\pm 8.7\%$  に対し各々  $29.4\pm 11.2\%$ 、 $17.6\pm 7.2\%$  ( $p<0.05$ ) と用量依存性に減少した。また、proHB-EGF の juxtacrine 活性を検討するため、単一細胞と重層細胞のアポトーシス減少率を比較したところ、10g/ml CRM197 添加時の単一細胞のアポトーシス減少率が  $20.4\pm 15.3\%$  であるのに対し、重層細胞では  $52.1\pm 18.3\%$  と著明なアポトーシスの抑制が認められた ( $p<0.05$ )。

## 考察

本研究により HB-EGF およびその受容体である HER1, HER4 がヒト黄体化顆粒膜細胞に存在し、また、HB-EGF mRNA の発現が sHB-EGF の刺激により短時間で上昇することより LGC での HB-EGF は autocrine 作用を有し、

かつ immediate-early gene であることを明らかにした。さらに、sHB-EGF 添加により LGC の細胞分裂が促進され、アポトーシスが用量依存性に抑制される結果より、溶解型の HB-EGF は LGC の増殖促進、アポトーシスの抑制作用を有するものと考えられた。一方、HB-EGF とその受容体である HER1 の阻害作用を有する CRM197 の添加により、アポトーシスが抑制された結果は、無血清培地下での培養により産生される内因性の HB-EGF は逆に、アポトーシスを誘起することを示唆するものである。無血清培養下では ectodomain shedding が起こらないために HB-EGF の大部分は proHB-EGF として存在することより、proHB-EGF は juxtacrine/autocrine 作用を介し、黄体細胞のアポトーシスを促進するものと考えられる。このように HB-EGF の溶解型と膜アンカー型は相反する生理作用を有することが示唆された。さらに、CRM197 添加により単一細胞に比較し重層細胞でのアポトーシスの減少率が高率であったことより proHB-EGF のアポトーシス誘起作用は主に juxtacrine によることが示唆された。HB-EGF と HER1 の結合阻害によりアポトーシスが抑制され、また、HER4 は LGC における発現量が低く、しかも細胞核内に留まっていることから、proHB-EGF のアポトーシス誘起作用は HER4 を介する機構より主に HER1 受容体を介するものであると考えられる。

HB-EGF およびその受容体がヒト黄体化顆粒膜細胞に存在し、溶解型の sHB-EGF は黄体化顆粒膜細胞の生存と増殖を促進し、一方、膜アンカー型の proHB-EGF はアポトーシスを誘起することを明らかにした。以上の成績から、HB-EGF は局所因子として黄体形成とアポトーシス調節機構を介し、ヒト黄体退縮に重要な役割を果たすことが示唆された。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料3)

The soluble and membrane-anchored forms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor appear to play opposing roles in the survival and apoptosis of human luteinized granulosa cells

Molecular Human Reproduction 8: 8; 734-741, 2002

(5) 一酸化窒素の Maus 卵子成熟、胚発育、着床機構に及ぼす影響に関する

## 研究

我々はこれまでの研究から、フリーラジカルの発生が卵子凍結障害の一因となることを明らかにしてきた。さらに、フリーラジカルが排卵機構に関与することが報告されており、卵胞、卵子の発育、成熟になんらかの生理的意義を有する可能性も示唆されている。今回、フリーラジカルの生殖生理学における意義を検討することが、未熟卵胞、卵子の体外発育の確立に寄与することを想定し、一酸化窒素 (NO) の卵子成熟、受精、初期胚発育に及ぼす影響に関しマウスを用い基礎的研究を行った。

### 研究目的

フリーラジカル的一种である一酸化窒素 (NO) が排卵機構、卵胞の発育に関与することが示唆されており、また、eNOS ノックアウトを用いた実験結果から、NO が排卵機構ばかりではなく、卵子の成熟機構に関与することも報告されている。しかし、NO の卵子成熟ならびに初期胚発育への生理的意義に関しては統一した見解が得られていない。今回マウス卵を用い NO の卵子成熟、受精、初期胚発育さらには着床機構への関与を *in vitro* 培養系で検討した。

### 研究方法

過排卵処理した ICR マウスより卵核胞期卵子 (GV)、排卵卵子、交配 24 時間後の 1 細胞期卵子を回収した。HTF または KSOM 培養液中に NO 供与剤 (SNP), NOS 阻害剤 (L-NAME) を添加し、卵子成熟率、受精率、胞胚への発育率に関し検討した。さらに、胞胚期卵を採取し、*in vitro* でのハッチング率、フィブロネクチンをコートした培養器への接着、トロホブラストの *out growth* におよぼす SNP, L-NAME の影響に関し検討を加えた。

### 研究成績

#### 1. 卵子成熟、受精に及ぼす SNP, L-NAME の影響

裸化卵子 (NkO 群) においては  $10^{-3} - 10^{-7}$  M 濃度の SNP は卵子成熟に影響を及ぼさないが、卵丘細胞付着卵では低濃度 ( $10^{-7}$  M) の SNP は核成熟を促進し、L-NAME の添加により成熟促進作用は抑制された。一方、L-NAME は裸化卵子の成熟には影響を与えないが、卵丘細胞付着卵子の核成熟を用量依存的に抑制した。受



精率に関しては SNP, L-NAME とも影響が認められなかった。

## 2. 初期胚発育に及ぼす SNP, L-NAME の影響

SNP および L-NAME の添加により用量依存性に 1 細胞期より胞胚期までの胚発育が抑制された、同様に、ハッチング率も SNP, L-NAME 共に抑制した。

## 3. 胚のアウトグロースに及ぼす SNP, L-NAME の影響

高濃度( $10^{-3}$  M) SNP の添加により胞胚のアウトグロースは有意に抑制されたが、逆に低濃度( $10^{-7}$  M) SNP は有意に促進した。一方、L-NAME は用量依存性にアウトグロースを抑制し、この抑制効果は SNP の同時添加により解除された。

## 考察

今回の研究により低濃度の NO は卵子の核成熟を促進し、一方、NOS 阻害剤は用量依存性に核成熟を抑制する結果が得られた。この結果は生理学的濃度の NO は卵丘細胞のヌクレオチド産生制御を介し卵子の核成熟に促進的に作用することを示唆するものである。一方、初期胚発育に関しては NO および NOS inhibitor の投与が胚発育を抑制することより、胚自信から産生される生理学的量の NO は胚発育に必須であり、さらに、初期胚は NO レベルの変化に極めて感受性が高いものと推測される。さらに、低濃度の NO が胞胚のアウトグロースを促進し、L-NAME が抑制することより、NO がサイトカインネットワークなどを介し、着床機構に深く関与していることが示唆される。女性の内性器内に NOS の存在が報告されていることから、胚は常に NO に暴露されていることが明らかであり、NO は卵子の核成熟、胚発育、着床過程に重要な役割を有しているものと考えられる。また、卵子成熟、初期胚発育、着床において、その促進、抑制に作用する NO 濃度に差が認められることより、胚の各発育ステージで NO に対する感受性が異なるものと考えられる。

本研究成績は未熟卵胞の発育にも NO が深く関与する可能性を示唆するものと考えられる。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料 4)

Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro

Molecular Reproduction and Development 58:262-268, 2001

## まとめ

### 1. 異種間移植のための未熟卵胞の凍結保存、マイクロカプセルの開発に関する基礎的研究

凍結保存融解後のマウス未熟卵胞（原始卵胞、一次卵胞）の異種間移植のためのマイクロカプセルを開発し、未熟卵胞を異種動物（ラット）へ移植し、成熟卵胞・卵子を獲得することを第一の目的とし、また、この異種間未熟卵胞移植の実験モデルから、初期卵胞の発育機構に関し、卵細胞からのシグナリングを中心に解明することを目的として基礎的研究を行った。

その結果、緩徐凍結法により未熟卵胞の凍結保存の可能性が示唆され、NO および活性酸素の消去が凍結融解後の生存率の向上に寄与することを明らかにした。また、マイクロカプセルを用いた未熟卵胞の体外成熟、同種間移植による卵胞の成熟が確認されたが、異種間移植には成功しておらず、今後、免疫抑制剤の検討、マイクロカプセルの改良など検討の必要性が示された。一方、卵胞発育に関するシグナリングに関する検討においては未熟卵子に GDF-9, C-kit の mRNA を確認したが、今後、FAK, FLT3, c-fms を含め定量的検討が必要であると考えられた。

### 2. フリーラジカルスカベンジャーのマウス未受精卵凍結保存に及ぼす影響

未熟卵胞の凍結保存の確立を最終目的として、その前段階として未受精卵の効率的な凍結保存法の確立のため、凍結融解過程で発生する各種のフリーラジカルの影響に関し基礎的研究を行った。

その結果、卵子の凍結障害は凍結融解時に発生するフリーラジカルが卵細胞膜脂質の過酸化を誘起し、それにより細胞膜の機能障害、DNA障害が惹起され最終的に卵子がアポトーシスを起こす機構が示唆され、酸化、還元システムのバランスが卵子の生存に重要であることを明らかにした。

一方、凍結融解時にNOが産生され、同様に発生する活性酸素との相互作用により産生される毒性の強いパーオキシナイトライトが卵子凍結時の細胞障害の主要な要因であり、これらのフリーラジカルの除去により生存率が上昇する可能性を示唆した。したがって、未熟卵胞の凍結保存に関しても、これらのフリーラジカルの影響を除去することが、至適な凍結保存法の確立につながるもの

と考えられる。

### 3. 卵細胞質内精子注入後の体外成熟マウス卵の細胞遺伝学的検討

未成熟卵子の体外培養および凍結保存により透明帯の硬化が惹起され、受精率の低下に連がることが報告されている。未熟卵胞の凍結融解後にもこの現象が起きることは十分に予想されることであり、受精には顕微授精が必須な方法となる。しかし、現在のところ体外成熟卵の顕微授精により得られた受精卵の細胞遺伝学的検討は十分に行われておらず、細胞遺伝学的安全性が確立していない。本研究は体外成熟および顕微授精の卵子染色体への影響を検討することによりその安全性を明らかにすることを目的とし、基礎的研究を行った。その結果、体外成熟後の顕微授精により得られる受精卵が、体内成熟後の顕微授精により得られる受精卵と同等の染色体正常性を有することを明らかにし、成熟卵の採卵が困難な不妊婦人の治療法としての安全性を示唆するだけでなく、未熟卵胞凍結保存後に得られた受精卵の正常性をも示唆する結果であると考えられる。

### 4. ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子 (HB-EGF) のヒト黄体化顆粒膜細胞の生存及びアポトーシス調節機構に関する研究

近年 HB-EGF が卵胞発育、初期胚発育、着床など生殖生理に深く関与していることが明らかにされつつあり、我々もこれ迄 HB-EGF が卵子の成熟および初期胚発育に促進的作用を有することを明らかにしてきた。一方、未熟卵胞、卵子の発育、成熟に多くの局所因子が関与することも報告されている。今回、未熟卵胞、卵子の発育、成熟におよぼす局所因子の作用に関し検討するため、HB-EGF に着目し、HB-EGF のヒト黄体化顆粒膜細胞における役割に関し基礎的研究を行った。

その結果、HB-EGF およびその受容体がヒト黄体化顆粒膜細胞に存在し、溶解型の sHB-EGF は黄体化顆粒膜細胞の生存と増殖を促進し、一方、膜アンカー型の proHB-EGF はアポトーシスを誘起することを明らかにした。以上の成績から、HB-EGF は局所因子として黄体形成とアポトーシス調節機構を介し、ヒト黄体の形成・退縮に重要な役割を果たすことが示唆され、未熟卵胞の発育、

成熟機構にも HB-EGF が関与する可能性が示唆された。

## 5. 一酸化窒素の Maus 卵子成熟、胚発育、着床機構に及ぼす影響に関する研究

我々はこれまでの研究から、フリーラジカルの発生が卵子凍結保存障害の一因となることを明らかにしてきた。また、フリーラジカルが排卵機構に関与することが報告されており、卵胞、卵子の発育、成熟にも生理的意義を有する可能性も示唆されている。今回、フリーラジカルの生殖生理学における意義を検討することが、未熟卵胞、卵子の体外発育の確立に寄与することを想定し、一酸化窒素 (NO) の卵子成熟、受精、初期胚発育に及ぼす影響に関し Maus 卵を用い基礎的研究を行った。

その結果、生理学的濃度の NO は卵丘細胞のヌクレオチド産生制御を介し卵子の核成熟の促進に関与することを明らかにした。一方、初期胚発育に関しては、胚自体から産生される生理学的量の NO が胚発育に必須であり、さらに、初期胚は NO レベルの変化に極めて感受性が高いことを明らかにした。さらに、低濃度の NO が胞胚のアウトグロースを促進し、L-NAME が抑制することより、NO がサイトカインネットワークなどを介し、着床機構に深く関与していることを示した。したがって、NO は卵子の核成熟、胚発育、着床過程に重要な役割を有しており、また胚の発育ステージで NO に対する感受性が異なることが示唆され、未熟卵胞の発育にも NO が深く関与する可能性を示唆する結果であると考えられた。

以上の研究結果より初期の目的の基礎的部分は達成されたものと思われる。しかし、異種間移植による卵胞発育は確認されておらず、また、oocyte factor による卵胞発育評価に関しても十分な成績を得るに至っていない。今後、マイクロカプセルの改良、FAK, FLT3, c-fms を含め oocyte factor の定量的検討など、さらなる検討を加えて行く必要があると考えられる。