

氏 名	かた おか のぶ ひこ 片 岡 信 彦
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1611 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Preparation of highly purified porcine theca cells (ブタ卵巢莢膜細胞の高純度分離培養法)

論文調査委員	(主 査) 教 授 塩 田 浩 平	教 授 藤 田 潤	教 授 森 崇 英
--------	----------------------	-----------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

卵巢莢膜細胞の高純度分離培養及びその内分泌的研究

(主論文; ブタ卵巢莢膜細胞の高純度分離培養法)

序論; 卵巢における卵胞は、内層は顆粒膜細胞でしめられ、莢膜細胞で外層をおおわれており、FSHにて顆粒膜細胞は増殖分化し、LHにて刺激を受けた莢膜細胞からアンドロゲンを分泌しこれを材料として顆粒膜細胞からエストロジェンを分泌し、卵胞の発育、やがて卵子を排出する排卵という現象へと続く。このように卵巢におけるステロイド産生は、性腺刺激ホルモンのもとで、卵胞に存在する二種類の体細胞(顆粒膜細胞と莢膜細胞)の協調によって行われる。

これまでの研究は、それぞれの細胞の発育、分化にたいする autocrine, paracrine そして endocrine 的な調節機構を明らかにしてきた。さらに卵胞における詳細な研究を行うためにも、両細胞のそれぞれ純度の高い分離培養が要求されるようになってきた。顆粒膜細胞は卵胞内層にゆるく結合しているというその組織学的特異性により、比較的容易に、さらに1960年代という早い時期から、その分離培養は確立され研究も進んでいる。しかし、莢膜細胞分離においては、卵胞外層に間質の中に存在するために周囲との結合は強いといった組織学的特徴のため、また、卵胞より容易に分離される顆粒膜細胞が混入しやすいといった状況のために純度の高い分離方法は確立されていなかった。

さらに、両者の分離方法においてそれらの純度評価に関しては、これまで明確には確立していなかった。

目的; 本研究の目的は、莢膜細胞の高純度分離培養法の確立、また、得られた顆粒膜細胞、莢膜細胞の純度評価法の確立にある。

方法; ブタ卵巢から中サイズ卵胞(3~6mm 直径)を得て、これより機械的、酵素処理の手法を繰り返して徹底的に顆粒膜細胞を除去することにより莢膜細胞を採取し、両細胞を得た。これらを10% FCS 添加した培地 RPMI 1640 に 2.5×10^5 細胞を培養し、その培養液から androstenedione, estradiol, および progesterone を RIA 法にて測定した。一部細胞は cytopsin smear を作成し ORO 染色, 3β -HSD 活性染色を行い、ステロイド産生細胞の割合を調べた。

また、FSH 刺激によるステロイドホルモン産生の差異を調べた。さらに、純度評価法の確認のために、得られた両細胞を種々の割合で人工的に混在させて純度を調べた。

結果；両者の内分泌的相違は 1) 40 時間 2.5×10^5 cells では莢膜細胞は、E2 を $239.1 \pm 35.1 \text{ pg/ml}$ 産生するが顆粒膜細胞はアンドロゲン供給無しでは産生しない。2) 莢膜細胞は androstenedione を産生するが ($66.5 \pm 10.4 \text{ ng/ml}$)、顆粒膜細胞は産生しない。3) FSH は莢膜細胞のプロゲステロン産生を刺激しない。顆粒膜細胞においては 12 時間培養では刺激しないが 40 時間ではプロゲステロン産生を刺激する。4) 莢膜細胞は 48 時間の間 androstenedione を産生続ける。これらの結果は、従来から予想されていたが、実際に培養で明確に示したのは初めてである。また、これら両者の内分泌的動態の差異を用いればその純度の評価法として利用ができる。この評価法を用いれば、人工的に両者を種々の割合で混在させた(純度の低い)状態では、3%以上の顆粒膜細胞が混在してもその混在を検出できた。

参考論文において述べたように、上記の分離培養法をヒト卵巣においても、応用できた。

論文審査の結果の要旨

本研究は卵巣莢膜細胞の高純度分離培養法の確立、および得られた莢膜細胞の純度評価法の確立、さらにはその内分泌的動態を検討したものである。

ブタ卵巣から卵胞を得て、これより機械的および酵素処理的手法を繰り返し徹底的に顆粒膜細胞を除去することによって莢膜細胞を採取し、両細胞を得た。以下の 3 項目を両細胞の純度評価とした。

(1)ブタ莢膜細胞は C18steroids を産生できるが顆粒膜細胞は材料となる androgen がなければ産生できない。

(2)莢膜細胞は C19steroids を産生できるが顆粒膜細胞はできない。

(3)FSH は莢膜細胞の steroidogenesis には影響を与えない。ただし、この際 FSH が顆粒膜細胞の steroidogenesis に影響を及ぼすことを確認する必要がある。

以上の純度評価より、顆粒膜細胞の混入が 3%未満である純度の高い莢膜細胞が得られた。さらに、この培養法は、ヒト卵巣にも応用ができた。

以上の研究は、卵巣内分泌の解明に貢献し、生殖生理学に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 9 年 2 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。