

学 位 論 文 題 名

In-vitro culture of mouse preantral follicles
and its application to the analysis of transforming
growth factor- β 1 expression in the developing follicles

（マウス前胞状卵胞の体外培養法と発育卵胞における
トランスフォーミング増殖因子- β 1発現解析への応用）

学位論文内容の要旨

卵巣内に多数存在する前胞状卵胞を体外で培養して正常な機能を有する成熟卵胞と卵母細胞を得ることができれば、体外受精によって多数の産子を作出したり、個々の卵胞や卵母細胞の発育・成熟過程の検討も可能になる。しかし、初期の前胞状卵胞の体外培養に関する報告は少なく、培養卵胞の卵母細胞の発生能を確認した報告もない。そこで、本研究ではマウスの初期前胞状卵胞を個別に培養する方法について検討を加え、マウス卵胞の発育過程におけるトランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF- β 1)の発現様式の解析に応用した。

はじめに、成熟マウスから採取した前胞状卵胞を直径により 125~150 μ m と 151~175 μ m の 2 群に分類し、それぞれタイプ 4 および 5a の発育ステージの前胞状卵胞であることを確認した。このタイプ 4 および 5a の卵胞を FSH 添加培地を用いて 6 日間培養し、卵胞の発育特性、培養卵胞から得られた卵母細胞の体外成熟能ならびに体外受精後の胚盤胞への発生能について検討した。その結果、大部分のタイプ 4 および 5a の卵胞 (76 および 89%) は、それぞれ培養開始後 5~6 日目および 4~5 日目に卵胞腔を形成した。両タイプの前胞状卵胞が卵胞腔を形成した時の直径 (300~320 μ m) に差異はみられなかったが、タイプ 5a を培養した場合にのみ卵胞腔形成後に著明なエストラジオール産生増加が認められた。また、タイプ 4 および 5a 由来の胞状卵胞から得られた卵母細胞の成熟率 (62 および 70%) および卵割率 (35 および 30%) に差異はみられなかったが、タイプ 5a 由来の卵母細胞だけが胚盤胞へ発生した (13%)。これらの結果より、タイプ 5a および 4 の前胞状卵胞を本実験の条件下で個別培養すれば、それぞれ正常発育卵胞と機能不全あるいは退行過程にある卵胞のモデルとして使用できることが示唆された。

ついで、体内でのマウス卵胞の発育に伴う TGF- β 1 の発現様式を明らかにす

るため、発情間期、前期、発情期（hCG 投与後 10 時間目）および排卵期（同 12.5 時間目）の成熟マウスの卵巣の連続薄切標本を作製して TGF- β 1 の免疫染色を行った。その結果、TGF- β 1 陽性の顆粒層細胞および卵胞膜内膜細胞は、卵胞腔形成直前の卵胞（タイプ 5b）で初めて出現し、発情間期のタイプ 6 から発情期のタイプ 8 へと卵胞が発育するにしたがって顆粒層細胞の TGF- β 1 陽性率は 13% から 82% に増加した。一方、卵胞膜内膜細胞の TGF- β 1 陽性率は、排卵期に退行過程にあるタイプ 7 および未排卵のタイプ 8 の卵胞で高い値を示した（79 および 55%）。これらの結果から、正常発育卵胞では卵胞腔形成期前後の顆粒層細胞で TGF- β 1 が発現し、卵胞の発育および分化に関与することが示唆された。

卵胞腔形成時期の顆粒層細胞における TGF- β 1 発現について確認するため、タイプ 5a および 4 の前胞状卵胞を正常および退行卵胞のモデルとして個別培養し、卵胞の発育、ステロイドホルモン産生および TGF- β 1 発現の関係を検討した。その結果、両タイプ由来の卵胞の発育や卵胞腔形成時の直径に差異はみられなかったが、タイプ 5a 由来卵胞はタイプ 4 由来卵胞に比べて顆粒層細胞数が多く、卵胞腔形成後に明らかなエストラジオール産生増加を示すことが確認された。さらに、タイプ 5a 由来卵胞はタイプ 4 由来卵胞に比べて卵胞腔形成時の顆粒層細胞の TGF- β 1 陽性率が高く（71 および 11%）、正常発育卵胞の顆粒層細胞では卵胞腔形成時に TGF- β 1 が発現するという体内発育卵胞を用いた試験で示唆された所見を支持する結果が得られた。

以上の研究結果から、個別培養されたマウス初期前胞状卵胞、とくにタイプ 5a の前胞状卵胞の発育特性やステロイドホルモン産生能は体内発育卵胞に類似しており、その卵母細胞は胚盤胞への発生能を有することが明らかになった。また、卵巣の免疫組織学的検索で示唆された卵胞発育に伴う TGF- β 1 発現、すなわち正常発育卵胞の顆粒層細胞では卵胞腔形成時に TGF- β 1 の発現することが培養卵胞においても確認され、前胞状卵胞の個別培養法が卵胞発育機構の研究に有用であることも示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 助 教 授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

In-vitro culture of mouse preantral follicles and its application to the analysis of transforming growth factor- β 1 expression in the developing follicles

(マウス前胞状卵胞の体外培養法と発育卵胞における
トランスフォーミング増殖因子- β 1発現解析への応用)

卵巣内に多数存在する前胞状卵胞を体外で培養することができれば、卵胞や卵母細胞の発育・成熟機構の解明に役立つ。申請者は、マウスの初期前胞状卵胞の個別培養法について検討を加えるとともに、発育卵胞におけるトランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF- β 1)の発現解析に応用した。

はじめに、成熟マウスから採取した発育ステージの異なる前胞状卵胞 (タイプ 4 および 5a) を培養して、卵胞の発育特性、卵母細胞の体外成熟能ならびに体外受精後の胚盤胞への発生能について検討した。その結果、タイプ 5a 前胞状卵胞の体外発育は体内発育卵胞に類似し、卵胞腔形成後に著明なエストロゲン産生の増加を示すとともに、卵母細胞も胚盤胞へ発生することを明らかにした。

ついで、マウス体内の卵胞における TGF- β 1 の発現について、卵巣の連続切片標本作製して免疫組織学的に検索した。とくに、正常な発育経過と推定されるステージの卵胞について解析した結果、正常発育卵胞では卵胞腔形成期前後の顆粒層細胞に TGF- β 1 が発現し、卵胞の発育や分化に関与することが示唆された。

そこで、卵胞発育に伴う TGF- β 1 の発現を確認するため、タイプ 5a および 4 の前胞状卵胞を、それぞれ正常および退行卵胞のモデルとして個別に培養し、卵胞の発育、ステロイドホルモン産生および TGF- β 1 発現の関係を検討した。その結果、発育 (顆粒層細胞の増殖) や機能 (エストロゲン産生) が正常なタイプ 5a 由来の卵胞では、卵胞腔形成時期に TGF- β 1 の発現することが確認された。

以上のように、申請者は個別に培養したマウス初期前胞状卵胞の発育特性、ステロイドホルモン産生能および培養卵胞の卵母細胞の発生能を明らかにするとともに、卵胞発育に伴う TGF- β 1 発現様式の究明に卵胞培養法を応用して、

その有用性を示した。よって、審査員一同は、申請者が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有すると認めた。