

氏 名（本籍）	石 放 雄（中華人民共和国）
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第86号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	Regulatory Mechanisms of Ovarian Functions in the Guinea Pig
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 田 谷 一 善 副査 帯広畜産大学 教授 山 田 純 三 副査 岩 手 大 学 教 授 三 宅 陽 一 副査 東京農工大学 教授 加茂前 秀 夫 副査 岐 阜 大 学 教 授 武 脇 義

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

モルモットは草食性であり、生殖生理学的特徴として、①齧歯類では珍しく発情周期中に卵胞期と黄体期を持つこと、②発情周期中の卵胞の発育に2回の卵胞発育波を示すこと、③平均産子数は2-4匹と少ないこと、④外因性ホルモンを用いて、過排卵を誘起することが難しいこと、着床に際しては、⑤胚盤胞壁内着床（間質着床）を示し、絨毛膜が合胞体性栄養膜であること、並びに⑥卵巣嚢腫の発生率が高いことなどが知られており、ウシやヒトなどの生殖生理学を研究する上で、有用なモデル動物として注目されている。しかし、モルモットの生殖生理学に関しては、未だ未解明の部分が多い。本研究では、ハートレー系雌モルモットを用いて、卵巣機能調節機構を内分泌学的に解析した。

第1章では、緒論として、モルモットの生殖生理学的な特徴、インヒビンおよび卵胞刺激ホルモン（FSH）分泌について記述し、本研究の目的を述べた。

第2章では、本研究に共通する実験材料と方法について記述した。

第3章では、モルモットの発情周期中における卵胞発育と各種ホルモン分泌の関係を明らかにする目的で、①血中FSH、インヒビン、エストラジオールおよびプロジェステロン濃度の変化、並びにインヒビンの分泌細胞に関する知見をまとめた。

## 1. 発情周期中の血中各種ホルモン濃度

成熟雌モルモットの膣スメア像を指標に判定した排卵日を基点として、発情周期中を通して毎日血中 FSH、インヒビン、エストラジオールおよびプロジェステロン濃度を測定した。その結果、血中インヒビンとエストラジオール濃度の変化は、正の相関を示し、卵胞期に高く、排卵により低下し、黄体期には低値で経過した。血中 FSH 濃度は、卵胞期に低く、黄体期に上昇し、インヒビンとは逆相関を示した。血中プロジェステロン濃度は、排卵後上昇し、黄体期に高値を示した。

## 2. インヒビンの分泌源

雌モルモットのインヒビン分泌源を明らかにする目的で、卵巢を摘出し、経時的に血中インヒビン濃度を測定した結果、血中インヒビン濃度は急激に減少した。この結果から、雌モルモットの卵巢がインヒビンの分泌源であることが明らかとなった。さらに、卵巢内におけるインヒビン分泌細胞を明らかにする目的で、免疫組織化学法を用いて、インヒビンサブユニットを染色した結果、卵巢に存在する 1-3 個の大型胞状卵胞の顆粒層細胞に、インヒビン  $\alpha$  鎖、 $\beta$  A 鎖および  $\beta$  B 鎖の陽性反応が認められた。同一の卵巢に存在するその他の小型、中型卵胞および大型卵胞には、陽性反応は認められなかった。また、黄体や間質細胞には、陽性反応は認められなかった。以上の結果から、雌モルモットでは、将来排卵に至る、いわゆる主席卵胞の顆粒層細胞のみがインヒビンの分泌源であろうと推察された。

第 4 章では、これまで外因性ホルモンの投与によっては、過排卵誘起が困難であるとされてきたモルモットに対して、まったく新しい発想で考案した「インヒビンワクチン法」による過排卵誘起法に関する知見をまとめた。また、第 5 章では、第 4 章で実施した「インヒビンワクチン法」により過排卵を誘起したモルモットにおける卵胞の発育と主席卵胞の選抜についての知見をまとめた。さらに、第 6 章では、インヒビンワクチン法により過排卵した卵の受精能と胚の発育能について検討した知見をまとめた。

実験に際しては、プロジェステロンを充満したチューブを 3~5 週間背部皮下に移植した後、除去することにより発情周期を同期化したモルモットを用いた。抗原には、ヒツジインヒビン  $\alpha$  鎖ワクチン液 ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) および対照群として溶媒を用いた。その結果、インヒビンワクチン投与群では、黄体数とインヒビン  $\alpha$  鎖の陽性卵胞数が有意に増加した。血中エストラジオール濃度は、対照群に比較して有意な増加が認められたが、血中 FSH 濃度には差は認められなかった。さらに、インヒビンの能動免疫法により過排卵した卵の性状について検討した結果、受精率および胚の発育共に対照群と差の無い事実が明らかになった。

第 7 章では、インヒビンの受動免疫後のイムノグロブリン G (IgG) の卵巢内局在性に関する知見をまとめた。

インヒビン抗血清 (1ml) または正常ヤギ血清 (1ml) を静脈注射後、IgG は、胞状卵胞の卵胞液中に局在することが判明したことから、投与した IgG が卵胞液中に入ったものと推察された。この様な事実から、モルモットでは、卵胞液中に入ったインヒビン抗体が局所作用により卵胞発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

第8章では、雌モルモットに多発する卵巢嚢腫に関する知見をまとめた。

推定排卵日を基準に、発情周期中を通して毎日成熟雌モルモットから卵巢を採集し、各個体からそれぞれ1個の卵巢を組織学的に検索した。その結果、3種類の卵巢嚢腫を認めた。最も出現率の高い嚢腫は、漿液嚢腫で、発情周期を通して観察された (54/85, 63.5%)。この嚢腫は、卵巢網由来であり、ヒトの良性卵巢上皮腫に類似した組織像、すなわち「扁平上皮細胞で、多くは頭頂部絨毛を有する」を示した。一方、22.4% (19/85) に認められた卵胞嚢腫は、顆粒層が1~2層しか存在せず、常に漿液嚢腫と共存していた。また、1例には、卵巢傍体嚢腫が認められた。この様に各種の嚢腫を卵巢に有するモルモットでも、発情周期の長さには異常が認められず排卵を繰り返した。次に、それぞれの嚢腫の生理活性を調べる目的で、インヒビン $\alpha$ 鎖、 $\beta$ A鎖及び $\beta$ B鎖の免疫組織化学染色を行ったところ、いずれの卵巢嚢腫も陰性であった。以上の結果から、ハートレー系雌モルモットでは、発情周期を通して卵巢嚢腫が高率に認められることが確認された。これらの嚢腫は、ヒトおよびウシの卵巢嚢腫に類似することから卵巢嚢腫の発生機構解明に有用なモデルとなるものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、正常発情周期を回帰するハートレー系雌モルモットを用いて、卵巢機能調節機構を内分泌学的に解析した。

### 1. モルモットの発情周期中における卵胞発育と各種ホルモン分泌

#### 1) 発情周期中の血中各種ホルモン濃度

成熟雌モルモットの膣スメア像を指標に判定した排卵日を基点として、発情周期中を通して毎日血液を採集して卵胞刺激ホルモン (FSH)、インヒビン、エストラジオールおよびプロジェステロン濃度を測定した。その結果、血中インヒビンとエストラジオール濃度の変化は、正の相関を示し、卵胞期に高く、排卵により低下し、黄体期には低値で経過した。血中 FSH 濃度は、卵胞期に低く、黄体期に上昇し、インヒビンとは逆相関を示した。血中プロジェステロン濃度は、排卵後上昇し、黄体期に高値を示した。

#### 2) インヒビンの分泌源

雌モルモットのインヒビン分泌源を明らかにする目的で、卵巢を摘出し、経時的に血中インヒビン濃度を測定した結果、血中インヒビン濃度は急激に減少した。この結果から、雌モルモットの卵巢がインヒビンの分泌源であることが明らかとなった。さらに、卵巢内

におけるインヒビン分泌細胞を明らかにする目的で、免疫組織化学法を用いて、インヒビンサブユニットを染色した結果、卵巣に存在する1-3個の大型胞状卵胞の顆粒層細胞に、インヒビン $\alpha$ 鎖、 $\beta$ A鎖及び $\beta$ B鎖の陽性反応が認められた。同一の卵巣に存在するその他の小型、中型卵胞および大型卵胞には、陽性反応は認められなかった。また、黄体や間質細胞には、陽性反応は認められなかった。以上の結果から、雌モルモットでは、将来排卵に至る、いわゆる主席卵胞の顆粒層細胞が主なインヒビンの分泌源であろうと推察された。

## 2. インヒビンの能動免疫実験

インヒビンの能動免疫法を用いて卵胞発育を促進する過排卵誘起法（インヒビンワクチン法）について研究した。実験に際しては、プロジェステロンを充満したチューブを3~5週間背部皮下に移植した後、除去することにより発情周期を同期化したモルモットを用いた。抗原には、ヒツジインヒビン $\alpha$ 鎖ワクチン液（50 $\mu$ g/ml）および対照群として溶媒を用いた。その結果、インヒビンワクチン投与群では、黄体数とインヒビン $\alpha$ 鎖の陽性卵胞数が有意に増加した。血中エストラジオール濃度は、対照群に比較して有意な増加が認められたが、血中FSH濃度には差は認められなかった。さらに、インヒビンの能動免疫法により過排卵した卵の受精率およびin vitro培養法による胚の発育について検討した結果、受精率および胚の発育共に対照群と差の無い事実が明らかになった。

## 3. モルモットにおけるインヒビン $\alpha$ サブユニットに対する受動免疫後のイムノグロブリンG(Ig G)とインヒビン $\alpha$ サブユニットの卵巣内局在

インヒビン $\alpha$ サブユニットに対する受動免疫後のIg Gとインヒビン $\alpha$ サブユニットの卵巣内局在と卵胞発育について検討した。インヒビン抗血清(1ml)または正常ヤギ血清(1ml)を静脈注射後、IgGは、胞状卵胞の卵胞液中に局在することが判明したことから、投与したIgGが卵胞液中に入ったものと推察された。この様な事実から、モルモットでは、卵胞液中に入ったインヒビン抗体が局所作用により卵胞発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 4. モルモットの発情周期中に認められる卵巣嚢腫

推定排卵日を基準に、発情周期中を通して毎日成熟雌モルモットから卵巣を採集し、各個体からそれぞれ1個の卵巣を組織学的に検索した。その結果、3種類の卵巣嚢腫を認めた。最も出現率の高い嚢腫は、漿液嚢腫で、発情周期を通して観察された(54/85, 63.5%)。この嚢腫は、卵巣網由来であり、ヒトの良性卵巣上皮腫に類似した組織像(扁平上皮細胞で、多くは頭頂部繊毛を有する)を示した。一方、22.4%(19/85)に認められた卵胞嚢腫は、顆粒層が1~2層しか存在せず、常に漿液嚢腫と共存していた。また、1例には、卵巣傍体嚢腫が認められた。この様に各種の嚢腫を卵巣に有するモルモットでも、発情周期の長さには異常は認められず、排卵を繰り返した。次に、それぞれの嚢腫の生理活性を調べる目的で、インヒビン $\alpha$ 鎖、 $\beta$ A鎖及び $\beta$ B鎖の免疫組織化学染色を行ったところ、いず

れの卵巣嚢腫も陰性であった。以上の結果から、ハートレー系雌モルモットでは、発情周期を通して卵巣嚢腫が高率に認められることが確認された。これらの嚢腫は、ヒトおよびウシの卵巣嚢腫に類似することから卵巣嚢腫の発生機構解明に有用なモデルとなるものと考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分に価値あるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1. Shi,F., Ozawa,M., Komura,H., Yang,P-X., Trewin,A.L., Hutz,R.J., Watanabe,G. and Taya,K. (1999) Secretion of ovarian inhibin and its physiologic roles in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion during the estrous cycle of the female guinea pig. *Biology of Reproduction* 60, 78-84.
2. Shi,F., Ozawa,M., Komura,H., Watanabe,G., Tsonis,C.G., Suzuki,A.K. and Taya,K. (2000) Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* 118, 1-7.
3. Shi,F., Mochida,K., Ogura,A., Matsuda,J., Suzuki,O., Watanabe,G., Hutz,R.J., Tsonis,C.G., Suzuki,A.K. and Taya,K. (2000) Follicle selection in cyclic guinea pigs with active immunization against inhibin  $\alpha$ -subunit. *Life Sciences* 66, 2489-2497.
4. Shi,F., Mochida,K., Suzuki,O., Matsuda,J., Ogura,A., Tsonis,C.G., Watanabe,G., Suzuki,A.K. and Taya,K. (2000) Development of embryos in superovulated guinea pigs following active immunization against the inhibin  $\alpha$ -subunit. *Endocrine Journal* 47, 451-459.
5. Shi,F., Mochida,K., Suzuki,O., Matsuda,J., Ogura,A., Ozawa,M., Watanabe,G., Suzuki,A.K. and Taya,K. (2000) Ovarian localization of immunoglobulin G and inhibin  $\alpha$ -subunit in guinea pigs after passive immunization against the inhibin  $\alpha$ -subunit. *Journal of Reproduction and Development* 46, 293-299.
6. Shi,F., Watanabe,G., Trewin,A.L., Hutz,R.J. and Taya,K. (2000) Localization of ovarian inhibin/activin subunits in follicular dominance during the estrous cycle of guinea pigs. *Zoological Science* 17, 1311-1320.

#### 既発表学術論文

1. Kishi,H., Kondoh,M., Nagamine,N., Shi,F. Watanabe,G. Taya,K. (1997) Roles of the basal level of LH and FSH in the regulation of follicular development during pseudopregnancy in the rat. *Journal of Reproduction and Development* 43, 279-287.
2. Tohei,A., Shi,F., Ozawa,M., Imai,K., Takahashi,H., Shimohira,I., Kojima,T., Watanabe,G. and Taya,K. (2001) Dynamic changes in plasma concentrations of gonadotropins, inhibin, estradiol-17 $\beta$  and progesterone in cows with ultrasound-guided follicular aspiration. *Journal of Veterinary Medical Science* 63, 43-48.