

氏名 (本籍)	和田 恭 則 (茨 城)
学位の種類	獣 医 学 博 士
学位記番号	甲 第 13 号
学位授与の日付	昭和 51 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	牛卵胞液の生化学的並びに生物学的性状に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 大 地 隆 温 (副査) 教授 田 中 享 一 教授 古 泉 巖

論 文 内 容 の 要 旨

近年繁殖生理学領域における研究はめざましく、そのなかで卵巣は雌性性機能の中心として重要な意義をもつことはいまでもなく、従ってこれに関する種々な研究が次々に報告されてきているが、現在なお卵巣機能の全てが解明されたわけではない。

卵巣には卵胞の発育、成熟、排卵、黄体形成などの形態的な変化とステロイドホルモン生成の2つの大きな機能があり、これら2つは下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンを介して密接に関係しあっている。

卵巣は下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンによって、その機能が支配されていることに異論はない。しかしながら卵胞の発育、すなわち発育に伴う卵胞液の増加がいかなる機構によるものか、さらに卵胞液の性状の詳細について不明な点が多いのが現状である。

そこで卵胞液の性状、卵胞液の生成について、卵胞の発育に伴う卵胞壁、卵胞液の変化、卵胞液の精子に及ぼす影響、卵胞液の雌ラットの繁殖生理に及ぼす影響などを目的とし、今後臨床繁殖学領域への応用を考え主題の研究を行った。

なお、本研究に供した動物はホルスタイン種の経産牛で、卵胞液、血液は生体及び屠体より採取し、卵胞の大きさ、卵胞液の色調、透明度、蛋白質濃度(以下 T.P. と略す) 蛋白分画、免疫電気泳動的解析、尿素態窒素濃度(以下 U.N. と略す)、酸性ムコ多糖体濃度(以下 A.M.P. と略す)とその種類及び Na, K, Mg, イオン濃度、卵胞壁の組織像である。血液については、血清中の T.P., 蛋白分画、免疫電気泳動的解析, U.N., A.M.P., 及び Na, K, Mg イオン濃度などを測定した。

1. 卵胞液諸性状について (特に血清との比較並びに検査項目間の相互の関連性について)

卵胞液の色調及び透明度は、大部分のものが淡黄白色～淡黄色、透明であったが、一部無色の卵胞液が存在し、他の色調の卵胞液に比べて各成分に差が認められた。

卵胞液中の T.P. は血清中のそれより低く、両者間に有意な正の相関関係が認められた。

セ・アセテート膜法により卵胞液を泳動した結果、アルブミン分画に相当する位置に血清の電気泳動像にはみられない特異的な泳動像が認められた。そこで、この特異的な泳動像がいかなる原因によるものか検討する為、いくつかの前処理を行い、電気泳動をこころみた。その結果、卵胞液をヒアルロニダーゼで処理することにより、アルブミン分画に相当する部分の特異的な泳動像の改善が認められ、この特異的な泳動像は卵胞液中の AMP とアルブミンの結合に起因しているものと考えられる。さらにアルブミン分画に相当する

部分の特異的な泳動像の形状をA, B, C, D, Eの5型に分け、各型について卵胞液中の成分を検討した結果、各型の間に有意差が認められ、卵胞液の特異的な泳動像の各型はなんらかの卵胞の性質を現わしていると考えられる。

免疫電気泳動的解析の結果、卵胞液中に、血清中では検出されなかったある種の蛋白質が認められた。また卵胞の大きさ18.1 mm以上の卵胞液中及び血清中に、卵胞の大きさ18.0 mm以下の各区分の卵胞液では検出されなかった α_2 -マクログロブリン、IgMが認められた。

卵胞液中のU.N.は血清中のそれより低く、両者間に有意な正の相関関係が認められた。

電気泳動法を用いた卵胞液中のA.M.P.を分離、定性した結果、コンドロイチン硫酸A及びヘパラン硫酸の2種類のA.M.P.が検出されたが、血清中ではA.M.P.は検出されなかった。そこで卵胞液中でかなり多量のA.M.P.が検出された点、卵胞液中のA.M.P.の生成は卵胞壁細胞によるものであると考え、卵胞より採取した顆粒膜細胞の細胞培養を行い、その培養液からA.M.P.の検出を行ったが著者の行った方法では検出できなかった。

卵胞液中Na濃度は血清中のそれより低く、卵胞の大きさ13.1~18.0 mm, 18.1 mm以上の区分で、両者間にわずかではあるが有意な正の相関関係が認められた。

卵胞液中K濃度は血清中それより高い値を示すことが認められた。

卵胞液中Mg濃度は血清中のそれより高く、卵胞の大きさ8.0 mm以下、18.1 mm以上の区分で、両者間にわずかではあるが有意な正の相関関係が認められた。

卵胞液中K/Naは血清中のそれより高い値を示すことが認められた。

2. 卵胞の大きさと卵胞液諸性状について

卵胞の大きさが大きくなるに伴い、卵胞液の着色度が強くなる傾向が認められた。

さらに卵胞の大きさが大きくなるに伴い、卵胞液中のA.M.P.、コンドロイチン硫酸濃度(以下ch.-Aと略す)、ヘパラン硫酸濃度(以下H.S.と略す)、H.S./ch.-A、K濃度、Mg濃度、K/Naの低下する傾向が認められた。しかしNa濃度はわずかではあるが増加する傾向が認められた。

なお卵胞の大きさと卵胞液中のT.P.、U.N.の間には特別な関係が認められなかった。

3. 卵胞壁について

成熟過程にあると思われる直径13.1~18.0 mmのものの顆粒膜層と、内葉膜層の境界、とくに内葉膜の表層に近い部分の毛細血管の発達と充血が他の大きさの卵胞より著明なこと、直径18.1 mm以上の卵胞壁は菲薄で退行変化が著しいもの等が特徴的であった。なお、正体不明な黒色顆粒が、ある2, 3の卵胞中に認められたが、これについては、いまのところ不明である。

4. 卵胞囊腫牛について

野外において、臨床上卵胞囊腫と診断されたホルスタイン種の経産牛の卵胞液について、材料を採取し、血清とあわせて検査を行った。なお、これらの卵胞は当然のことであるが直径18.1 mm以上のものである。

A 卵胞液諸性状について(特に血清との比較)

卵胞液中のT.P.は血清中のそれより低く、両者間に有意な正の相関関係が認められた。

セ・アセテート膜法により、セバラックスを用い血清及び卵胞液の電気泳動を行った。その際、卵胞液については、前述のごとく卵胞液中にヒアルロナーゼを加え、アルブミン分画に相当する部分の特異的な泳

動像の改善をはかり蛋白分画比を算出した結果、卵胞液中のアルブミン、 β -グロブリン、A/Gは血清中のそれより高いことが認められたが、卵胞液中の α -グロブリンは血清中のそれより低いことが認められた。

血清と卵胞液の各蛋白分画値について、それぞれ相関関係を検討した結果、アルブミン、 γ -グロブリンに有意な正の相関関係が認められた。しかし、 α -グロブリン、 β -グロブリン、A/Gについては、有意な相関関係が認められなかった。

卵胞液中の U.N. と血清中のそれの間に、有意な正の相関関係が認められた。

卵胞液中の Na 濃度は血清中のそれより低いことが認められた。

K 濃度については特別な関係は認められなかった。

卵胞液中の Mg 濃度は、血清中のそれより低く、両者間に有意な正の相関関係が認められた。

卵胞液中の K/Na は血清中のそれより低いことが認められた。

B 子宮頸管粘液性状について

子宮頸管粘液 pH 及び結晶型と卵胞液性状との関連性は、著明な点は認められなかったが、一部何らかの関連性のある面も示唆された。

5. in vitro における牛卵胞液の精子運動性に及ぼす影響について

卵胞液、血清については前述のとおりである。精液は麻布獣医科大学銅養中のジャージー種から、人工産法で採取し、一般性状に異常のないことを確認の上、精子浮遊液を作製し実験に供した。

小試験管に 0.5 ml の卵胞液を入れ、毛細ピペットで 1 滴精子浮遊液を添加、軽く攪拌し、室温 (15°C) に静置、経時的にその少量をスライドガラス上に滴下し、加温装置上で鏡検し、精子生存率、活力、凝集状態を観察し、グルコチトラート液 0.5 ml に精子浮遊液を同様操作したものと対比した。なお、血清についても同様操作を行った。

精子生存状態、活力、凝集に対し、卵胞液によりかなり差のあることが認められ、精子凝集の程度の大きくなるに伴い卵胞液中の T.P. も高くなる傾向が認められた。

6. 牛血清中抗体の卵胞液内移行について

血清中の成分の卵胞液内移行の有無を目的とし、Brucella 死菌で免疫した牛の血清及び卵胞液の凝集価を観察した。その結果、菌体抗体は比較的容易に血清中から卵胞液中に移行することが認められた。

7. 牛卵胞液のラット性周期、妊娠などに及ぼす影響について

卵胞液中にはいろいろな成分が存在し、それらの成分は卵胞の発育に伴い変化をすることが認められた点、また受精現象が成立する際の卵胞液の役割の重要性を考え、牛卵胞液のラット繁殖生理に及ぼす影響について観察を行ったが、特別な変化は認められなかった。

結 語

卵胞液の成分は血清に由来するものがかなりあるが、その濃度は卵胞自身の機能によっても影響されることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

卵巣はそれのもつ 2 つの重要な役割、すなわち卵子の生産と性腺ホルモンの分泌母地として繁殖面に重要な貢献をしているものである。したがって、これら 2 つの分野に関する研究は極めて多数みとめられる。し

かし、これらの役割を発現させるための場を提供しているのは専ら卵胞である。したがって卵胞とくに卵胞液が直接、間接にこれらの機序に影響を及ぼすことは当然と考えられる。

すなわち、卵子は排卵まで常時卵胞液と接触しており、排卵時は卵胞液と共に卵管に流入し、待機していた精子と接触する。ちなみに、ある卵胞液は試験管内実験で卵子の減数分裂や、あるいは顆粒膜細胞の黄体化を阻止することが知られており、また排卵は卵胞液の滲透圧の変化に大いに影響されるといわれている。

著者はこのような意義をもつ卵胞液の研究の重要性を認識し、牛材料(屠場材料および野外卵胞のう腫牛)を用いて検討を行なったものである。

卵胞液についての研究も今まである程度なされているが部分的な報告が多いようである。

今回の報告は多数の材料につき、卵胞液の生化学的成分をまず測定し、卵胞液の性状の概略を把握すると共に、これらの各価を血清のそれと比較し、卵胞液の生成機序を推察するめやすとし、また卵胞の発育(大きさ)に伴ない、あるいは卵巣疾患(卵胞のう腫)のものに、なんらかの成分的な変化がみられるかどうかなど、卵胞そのものの独自の機能の推察をも試みている。

さらに、関連実験として、卵胞壁の組織的検査、精子運動性に及ぼす卵胞液の影響、血中抗体の卵胞液内移行の有無、卵胞液を投与した場合のラット性周期や妊娠に対する投与の影響などを試験し、相互の関連を考察し、従来断片的な実験が多かったこの分野に輪廓の広い実験成績を得べく配慮されたものである。

実験結果の概要を説明すると

諸成分について：

1) 卵胞液の色調透明度は大部分のものが帯黄色であったが一部無色のものがあり、他の色調のものにくらべ各成分にかなり差がみられた(機能低下が考えられるような)。

2) 卵胞液中の蛋白質濃度は血清中のそれより低く、両者間に有意な正の相関がみられた。

3) 電気泳動により、アルブミン分画に相当する位置に血清ではみられない特異的な鉤形の像が出現したが、ヒアルコナーゼ等の添加結果から、アルブミンと酸性ムコ多糖の結合形と考えられた。またこれらの形も5種類に大別されたが、それぞれの形と卵胞液中の成分には有意差がみとめられた。

4) 免疫電気泳動では血清中に認められなかったある種の蛋白質が認められた。また、18.1mm以上の大きい卵胞液および血清中に、それ以下の大きさの卵胞液では検出されなかった α -マクログロブリン、IgMが認められた。

5) 尿素窒素は血清中のそれより低く、両者間に有意な正の相関が認められた。

6) 酸性ムコ多糖は電気泳動の結果、コンドロイチン硫酸Aおよびヘパラン硫酸の2種であったが血清中にはこの方法では検出されなかった。また卵胞顆粒膜細胞の人工培養液中でも検出できなかった。

7) Naは卵胞液は血清に比べ低く、また卵胞の大きいものに高かった(有意の相関)。

Kは血清より高く、Mgも血清より高く、また小さい卵胞と大きい卵胞で両者間に有意な正の相関が認められた。

K/Naは卵胞液が血清より高い価を示した。

相互関係について：

先ず卵胞の発育(大きさ)について、卵胞が大きくなるにしたがい卵胞液の色調は濃くなり、酸性ムコ多糖、コンドロイチン硫酸-A、ヘパラン硫酸/コンドロイチン硫酸-A、K、Mg濃度、K/Naの低下する傾向

を認めている。しかし Na 濃度は、わずかではあるが増加する傾向を認めている。蛋白濃度、尿素窒素と卵胞の大きさとの間には特別な関係は認められなかったとしている。

卵胞のうち腫卵胞からの卵胞液も、やはり、大形の卵胞に類似の所見を示しているようである。

精子運動性におよぼす影響：

血清では精子と作用させた場合、殆どすべてのものが凝集を起したが卵胞液では、全々影響のないもの、血清と同程度のもの、僅かに凝集するもの等を認め、また生存率や生存期間、運動抑制作用等に卵胞液別の差を認め、同一牛の異なった卵胞から採取した卵胞液間にも差が存在したことを認めている。

血清中の抗体の卵胞内移行について：

ブルセラ死菌で免疫し、血清中に抗体が検出された牛の卵胞液を採取し、血清中とはほぼ同力価の抗体を認めており、かなり大きい分子も通過するように思われる。なお、この場合左右の 1 こずつの新旧両卵胞から採取したものであるが、両者間にはそれほど差はみられなかった。

ラットに投与した場合の影響：

これは外因的に投与された特定な関連物質が直接あるいは間接（免疫抗体の産生による自家抗原の物質の中和等）に性機能に影響を来たさないかという、予備的なものであるが、性周期、妊娠、産児数等には有意な差は認めていない。

なお、卵胞壁の組織も観察したが、成熟過程にあると考えられるやや大きい卵胞群に内葉膜層の毛細管の発達と充血を認めており、血液との関連を示唆する所見を得ている。また更に大きい、もう腫様の卵胞壁は粗鬆で退行変化が推察される所見を認めている。

以上の実験、とくに成分的なものは、卵胞のうち腫牛を含めると血清約 210 例、卵胞液約 620 例を対象に実験したものであるが、これらを通じて従来比較的個別に測定されていた諸成分を同時に測定し、牛におけるその平均的な価を提示したこと、血清と比較することにより卵胞液の生成機序を考察し、いわゆる機能的 blood-follicle barrier の存在を立証し、さらに卵胞の發育に伴う成分の推移についても関連性のあることを認めたこと、同一牛でも卵胞により、その性状はかなり異なっていること、あるいは精子に対しても必ずしも好適な条件でない卵胞液の存在すること、従来考えられていたほどヒアルロン酸が多くなかったこと等、従来卵巣のもつ特徴的機能である卵子生産、ホルモン分泌等の陰にかくれて、比較的目立たなかった卵胞液そのものを幅広く検討したこと、その結果、卵胞液について今後どのようなことがより重要な研究対象になりうるか等、数多くの示唆を与える結果を得たことは高く評価され、博士課程での学位論文に価することを認めるものである。