

主論文の要旨

**Follicle dynamics: visualization and analysis of  
follicle growth and maturation using murine  
ovarian tissue culture**

卵胞動態：マウス卵巣組織培養を用いた  
卵胞発育および成熟化の可視化と解析

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

邨瀬 智彦

## 【緒言】

近年、生殖年齢の女性患者において化学療法、放射線療法がもたらす妊孕性喪失が大きな問題と認識されている。妊孕性温存療法には、GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) アゴニスト投与、卵子凍結、受精卵凍結、卵巣凍結がある。しかし、GnRH アゴニストによる卵巣保護効果は不確実であり、卵子凍結、受精卵凍結は、原疾患の治療開始までの時間に猶予が少なく、将来的に生児を得られるほど凍結卵子、受精卵をストックできない可能性がある。卵巣凍結は、思春期前の女兒にも施行可能で、排卵誘発を必要としない上に、大量の卵胞を一度に保存可能であることが特徴で、最近実用化が進んでいる手法だが、自家移植時に卵巣内の悪性腫瘍細胞の再移入リスクがある。

そこで、摘出卵巣から体外で成熟卵子を得ることができれば、卵巣組織の自家移植を行わなくても、卵子凍結、受精卵凍結、胚移植が可能で、がん細胞の再移入リスクもないと考えられる。本研究ではマウス卵巣から成熟卵子を得るべく、我々が独自に確立した卵巣組織培養法で卵胞発育の経時的評価を行い、放出された卵母細胞の成熟度と合わせて解析を行った。

また、既報における卵胞発育の評価法は、卵巣組織の固定染色標本で各発育段階の卵胞数をカウントして処理前と処理後を比較することが主であった。本研究では、培養下にリアルタイムで撮影を繰り返して卵胞発育の評価を行い、さらにその過程で放出された卵母細胞の成熟度評価も行った。

## 【方法】

本研究は施設内倫理委員会の承認を得て実行された研究である。

3匹の4週齢ICRマウスから得た6個の卵巣を、それぞれ4片に切り分け2週間組織培養を行いつつ、1日1回の静止画撮影または30分毎のタイムラプス撮影を行って卵胞発育を評価した。35 mmディッシュの上に1 mLの培養液を入れ、土台となるCell Culture Insertsをのせ、その上にスライスした卵巣組織を置いた。これにより、卵巣組織は浮遊することなく正確な経時観察が可能となり、接地面からの栄養供給も保たれた。培養基剤はMinimum Essential Medium Alpha GlutaMax で、FBSが5%濃度となるように、また、FSH (Follicle stimulating hormone)、LH (Luteinizing hormone) を図1aのように添加したものを使用した。LH については、排卵前のサージを模して10倍量の周期的添加を行った。24時間毎に培養液を交換し、共焦点顕微鏡を用いて静止画撮影を行った。ImageJソフトウェアを利用して、各卵胞の面積を測定した。

培養中に放出される卵母細胞については、放出時の卵母細胞径と減数分裂期 (GV: Germinal Vesicle, MI: Metaphase I, MII: Metaphase II) を評価し解析を行った。一方、30分毎のタイムラプス撮影については、自動撮影機能付き顕微鏡内臓型インキュベーターを用いた。

## 【結果】

図1bは連日撮影した静止画の一部であるが、白線で示すように卵胞の周囲をトレー

スして卵胞面積を測定した。視認できる全ての卵胞面積を測定し、図1cでは各々の卵胞面積の推移と帰結を表した。各卵巣組織片あたりのトレース卵胞数は2から10個で、平均±標準誤差は7.08±0.85個であった。各卵巣あたりのトレース卵胞数は25、30、34個であった。

また、図1dで示したとおり、LHサージを模した添加後では、24時間以内に最も多く卵母細胞の放出を認めた。全トレース卵胞の33% (29/88) からMII卵 (成熟卵) を得た。24% (21/88) の卵胞は発育せず卵胞閉鎖に至った。

次に、卵母細胞放出直後の卵母細胞径を測定し、その時の卵胞面積および卵母細胞の減数分裂期との関係を図2a, bに示した。すると面積の大きい卵胞ほど、放出された卵母細胞径も大きく、卵母細胞のMII期到達率も高いことがわかった。

さらに、30分毎のタイムラプス撮影では、卵胞発育動態、放出卵母細胞の挙動、顆粒膜細胞の増殖について初めてライブイメージング化した。

## 【考察】

卵胞発育の評価法について、既報では卵巣組織の固定染色標本における各発育段階の卵胞数をカウントして評価することが主流であった。本研究では、培養下に連続的な撮影を繰り返すことにより各卵胞のダイナミクス評価が可能となり、さらにその過程で放出された卵母細胞の成熟度評価まで行った点が新しい。卵母細胞については、今回は形態学的な成熟度評価にとどめているが、種々の解析と応用が可能である。また、この培養系は外因性に増殖因子を添加してコントロール群と比較する実験も可能で、効果的な増殖因子の選定に寄与するだろう。

大きな卵胞から放出された卵母細胞ほど卵母細胞径が大きく、より成熟した卵母細胞であることを示したが、卵巣組織培養の系で初めてin vivoで起きている事象をex vivoで視覚化、実証したと考えている。

タイムラプス撮影では、卵胞形成、発育、卵母細胞放出、卵胞閉鎖の過程を初めて精細に可視化し、卵胞発育動態の把握に寄与したと考えられる。

がん患者における凍結卵巣自家移植では、卵巣内の悪性腫瘍細胞の再移入リスクがあるが、本研究をヒト卵巣に応用して体外で成熟卵を得ることが可能となれば、育児希望のある患者に多大な福音をもたらすことができる。しかし、ヒト卵巣では原始卵胞を初めとした初期卵胞がゴナドトロピン依存性卵胞まで発育するのに要する期間がマウスと比較して長いことが、長期培養の必要性を示唆しており課題となる。また、現状では得られた卵母細胞が成熟卵子である割合が高くないため、卵母細胞のIVM (In vitro maturation) に着手したところである。

最近、ヒトの後期二次卵胞以降の卵胞を単離、培養することにより成熟卵子を得たとする報告がなされた。原始卵胞、一次卵胞を単離、培養することは不可能と考えられており、我々が確立した器官培養の系は、この原始卵胞から後期二次卵胞までの発育促進に貢献できるのではと考えている。後期二次卵胞まで発育させることができれば、単離卵胞培養を行い、成熟卵子を獲得できると見込まれる。

**【結語】**

マウス卵巣組織培養による卵胞発育動態の視覚化と解析を行う実験系を構築した。また同時に、体外培養下で成熟卵子を得るシステムを確立した。この培養システムは、今後の卵巣組織培養の改良に貢献するだろう。今後、妊孕性温存療法として、ヒト卵巣組織の体外培養への応用が期待される。