

組織培養法による顆粒膜細胞, 莢膜組織の steroidogenesis の研究

—特に多嚢胞性卵巣症候群について—

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

吉 村 泰 典

Studies on Steroidogenesis of Isolated Granulosa Cells and Thecal Tissue in Tissue Culture —With Special Reference to Polycystic Ovary Syndrome—

Yasunori YOSHIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo

(Director: Prof. Rihachi Iizuka)

概要 多嚢胞性卵巣の steroidogenesis を解明するため, 卵胞を構成する主要細胞成分である顆粒膜細胞及び莢膜細胞を分離し, 培養, *in vitro* よりそれらの培養細胞の形態学的所見, steroidogenesis を正常卵巣と比較, 検討した.

① 顆粒膜細胞には単層培養系, 莢膜細胞には莢膜細胞層の組織片培養系を用い, 37°C, 95% air-5% CO₂ 下で18日間培養した.

② 培養顆粒膜細胞, 莢膜細胞は, 20%仔牛血清添加 TC 199で良好な発育を示し, それら培養細胞の発育形態ならびに超微形態において, 多嚢胞性卵巣, 正常卵巣との間の差異は存在しなかつた.

③ 培養顆粒膜細胞における主要生成ステロイドは progesterone であり, 多嚢胞性卵巣及び卵胞初期・中期の 6mm 以下の正常卵巣より採取した顆粒膜細胞のステロイド分泌能に差異は認められなかつた.

④ 培養莢膜細胞における主要生成ステロイドは androstenedione, testosterone などの androgen であり, 多嚢胞性卵巣における androgen 分泌優位の傾向が認められた.

⑤ estrogen substrate, FSH の非存在下での estradiol 分泌は, 培養顆粒膜細胞において低値であつた. また多嚢胞性卵巣, 正常卵巣の間の estradiol 分泌形式に差異が認められないことより, aromatizing enzyme の障害は否定的であつた.

以上の結果より, *in vitro* より見た多嚢胞性卵巣の steroidogenesis は, 培養顆粒膜細胞を見る限り, 正常卵巣との間に有意の差は認められないが, 培養莢膜細胞においては androgen 分泌亢進の傾向が見られ, LH 異常高値がその一因であると推察される.

Synopsis The purpose of this study is to determine the steroidogenesis of polycystic ovary syndrome (PCO), through the comparison of steroidogenic potential between polycystic and normal ovarian cells harvested from follicles under 6 mm in diameter *in vitro*.

1) The granulosa cells were cultured by monolayer culture method, while the thecal tissue by explant culture method, at 37°C using 5% CO₂ in air for 18 days.

2) The cultured granulosa cells and thecal tissue grew successfully under 20% fetal calf serum with 80% medium 199.

3) The major product secreted by the cultured granulosa cells was progesterone, and the difference of steroidogenic potential between normal ovary and PCO was not significant.

4) The major products of isolated thecal tissue were 4¹-androstenedione and testosterone. Particularly, the cultured thecal tissue from PCO accumulated more androgens, in comparison with that from normal ovary.

5) The secretion of estradiol by the cultured granulosa cells was low in the absence of estrogen substrate

and FSH. There was not appreciable difference in the capacity of granulosa cells from normal ovary and PCO to secrete estradiol.

These results suggest that steroidogenic potential of isolated granulosa cells from PCO is comparable to that from normal ovary, whereas thecal tissue from PCO has more androgenic capacity than that from normal ovary.

Key words: PCO・Steroidogenesis・Culture・Granulosa cell・Thecal tissue

緒言

多嚢胞性卵巣とは、卵巣が両側性に腫大し、白膜の肥厚及び白膜下に多数の嚢胞を有する卵巣を総称する。多嚢胞性卵巣症候群（以下 PCO）なる言葉の定義は、卵巣が多嚢胞化し、不妊、無排卵を主訴とする症候群を言い、本邦に於ては男性化徴候を示す典型的な Stein-Leventhal 症候群の頻度は少ない¹⁸⁾。

近年 radioimmunoassay (以下 RIA) などのホルモン測定法の進歩により、視床下部-下垂体-卵巣系の内分泌動態の検索がなされるようになった。本邦の PCO では、LH 異常分泌の他、欧米の報告⁹⁾に見られるように明らかな血中 androstenedione, testosterone に代表される androgen 高値を示す症例の少ないこと¹¹⁾¹⁸⁾が特徴的であり、それが男性化徴候の少ない理由と考えられている。われわれは、末梢血、卵巣静脈血の内分泌動態の分析成績より、PCO の steroidogenesis に検討¹²⁾を加えた。その結果、本症の卵巣静脈血中の 45 系ステロイドは、44 系ステロイドに比し特に異常高値を認めない点で、 3β -hydroxysteroid dehydrogenase の障害は否定できること、また本症の卵巣静脈血中の estrone, estradiol 値は、正常卵巣と比較してより高値を示す点で、aromatizing enzyme の障害は存在しないか、あるとしても軽微であると推論している。

今回われわれは、多嚢胞性卵巣の steroidogenesis をより直接的に検索するため、卵巣の主要構成細胞である顆粒膜細胞及び莢膜細胞を分離、培養し、それらの steroidogenesis を正常卵巣と比較、検討した。

実験材料ならびに方法

1. 実験対象

対照とした正常卵巣12例は、子宮筋腫11例、子宮頸癌1例で、年齢分布は24歳から43歳迄の正常

表1 PCO 診断 criteria

- | |
|---|
| 1) 第一度無月経 |
| 2) 頸管粘液0.2ml以上, FLP(##) |
| 3) Clomiphene (+HCG)にて排卵せず |
| 4) LH-RH testにてLH前値比較の高値(20 mIU/ml), 反応良好 |

飯塚・中村 (1975)

月経周期を有する婦人の卵巣初期・中期に開腹した際、採取した卵巣を使用した。PCO 14例は、年齢分布が26歳から32歳迄の飯塚・中村の PCO 診断 criteria²⁾(表1)をみたす症例に楔状切除術を施行し、開腹時に典型的な多嚢胞性卵巣所見を示した症例のみを今回の実験対象とした。

対照群としては卵巣初期・中期の6mm以下の卵巣を用い、PCO 卵巣としては楔状切除卵巣の一部を組織学的検索に供し、一部を今回の培養実験に使用した。摘出卵巣は、PBS下に無菌的に冷蔵保存し、摘出後2時間以内に実験に供した。

2. 採取時期の決定

対照群とした卵巣摘出に際しては、基礎体温表、術前の血中 LH, FSH, estradiol, progesterone 値及び子宮内膜組織診により、月経周期を決定した。PCO 患者の楔状切除術は、progesterone 25 mg 筋注にて消退出血後1~2週目に施行した。

3. 培養器具ならびに培養条件

培養容器は Falcon のプラスチック製 tissue culture dish 35×10mm (#3001)を、培養液は DIFCO の TC 199に GIBCO の20% fetal calf serum (以下 FCS), penicillin 100IU/ml, streptomycin 100μg/ml の割合で加えたものを使用した。各々の culture dish に2mlの培養液を加え、2日目毎に全量交換した。培養条件は37°C, 95% air-5% CO₂とし、培養期間を通じて培養液の pH は原則的に7.0~7.2の範囲を保つものとした。培養細胞の生育状態は、オリンパス倒立位相

表2 Culture technique of granulosa cells

1) Removal of individual follicles from ovaries
2) Aspiration by 26 gauge needle
3) Separation from follicular fluid by centrifugation at 600 g for 15 minutes
4) Suspension of cell pellet in medium TC 199 (pipetting)
5) Removal of ovum
6) Cell counting
7) Recentrifugation at 600 g for 15 minutes
8) Resuspension in medium TC 199 containing 20% FCS
9) Mono cell culture of granulosa cells explanted at a concentration 1×10^5 cells/ml medium, in 35×10 mm Falcon tissue culture dish
10) Culture at 37°C in a 95% air-5% CO_2 for 18 days

差顕微鏡で観察し、18日間培養した。

4. 実験方法

1) 顆粒膜細胞の培養方法 (表2)

顆粒膜細胞の培養は単層培養系を使用した。その培養方法は、無菌的に採取した卵巣を冷却したPBS下に静置し、各卵胞を周囲組織より遊離し、その直径を測定する。各卵胞より顆粒膜細胞を卵胞液と共に、26ゲージツベルクリン注射器にて吸引採取する。600g、10分間遠沈し、上清の卵胞液を除去した後、TC 199で2～3分間ピペットにて十分に細胞を拡散させる。顆粒膜細胞浮遊液より卵分離後、その一部を0.5% trypan blueで生体染色し、Thomaの血球計算板上で細胞生存率及び細胞数を算定する。その後再度600g、10分間遠沈し、20% FCS添加TC 199にて18日間培養した。細胞数は 10^5 cells/ml culture media、培養液は2ml/culture dishとした。

2) 莢膜細胞の培養方法 (表3)

顆粒膜細胞では容易に遊離細胞浮遊液を作成することが可能であるが、莢膜細胞では trypsin, collagenaseなどの化学的分散操作が必要となる。ところが、ヒト卵胞の場合、摘出材料に制限があるため、莢膜細胞の培養には組織片培養(explant culture)を使用した。その培養方法は、顆粒膜細胞採取後の卵胞をPBSを含む滅菌シャーレに入れ、実体顕微鏡下に卵胞を4分割、PBSで2～3回洗浄後、可能なかぎり顆粒膜細胞の混入を避け、莢膜組織を周囲の間質細胞と共に分離する。

表3 Culture technique of thecal tissue

1) Removal of individual follicles from ovaries
2) Aspiration of ovum, granulosa cells and follicular fluid by 26 gauge needle
3) Cut follicular wall into four pieces with a small steel knife
4) Scraping the inside of the quarter follicle with platinum loop and suspension in PBS twice
5) Removal of thecal tissue under the dissecting microscope
6) Fragmentation (1 mm^3 fragment) of thecal tissue after resuspension in TCM 199
7) Explantation of thecal tissue (3 pieces) in 35×10 mm Falcon tissue culture dish
8) Culture at 37°C in a 95% air-5% CO_2 for 18 days

分離組織をTC 199にて3回洗浄後、 1 mm^3 の組織片を作成、一部を組織学的検索に供し、culture dish 1ケにつき3片を貼布、培養液2ml/culture dishを加え、18日間培養した。

3) ホルモン測定法

2日目毎に全量交換した培養液は、 -20°C にて凍結保存し、培養液中に放出された progesterone (以下P)、 17α -hydroxyprogesterone (以下17OHP)、estradiol- 17β (以下 E_2)、estrone (以下 E_1)、androstenedione (以下 A_4)、testosterone (以下T)をRIA^{12),18)}にて測定した。

4) 透過電顕試料作成法

電顕観察用には0.25% trypsinにて単離細胞浮遊液を作成後、直ちに培養液にてその作用を止め、遠沈してcell pelletにする。cell pelletをpH 7.4のカコシル酸緩衝液を加えた2.5% glutaraldehyde、1% OsO_4 の二重固定を行った。固定資料はエタノールで脱水後、Epon 812に包埋し、LKB ultramicrotomeで超薄切片を作製した。その後飽和 uranyl acetate および Raynold 氏液による二重染色を施し、JEM 100-C 電子顕微鏡にて観察撮影した。

実験成績

1. 培養液の基礎的検討 (表4)

今回の実験で growth medium として使用した培養液は、20%の割合でFCSが含まれているため、予めそれらに含有される各種ホルモン濃度を測定した。growth medium 中の各種ホルモン濃

表4. Endogenous hormone concentration in the growth medium^a and control^b

	Growth medium	Control
Progesterone pg/ml	42.3	84.5 ^c
Estradiol pg/ml	9.6	28.1 ^c
17 α -hydroxy progesterone pg/ml	21.9	29.6 ^c
Testosterone pg/ml	40.0	50.6 ^c
4 ⁴ -Androstene dione pg/ml	20.0	21.4 ^c
LH mIU/ml	<1.9	
FSH mIU/ml	<1.9	

^a TC 199 contained 20% fetal calf serum

^b Mono cell culture of fibroblast originated from ascites of CIS patient

^c Steroid concentration produced by fibroblast explanted at a concentration 1×10^5 cells/ml medium

度は, 20% FCS 添加 TC 199 を2日間, 37°C, 95% air-5% CO₂ 下に静置した後のホルモン値を意味し, また control としては子宮頸癌0期患者の腹水細胞を使用し, 顆粒膜細胞と同条件下で2日間培養後, 培養液中に含まれる各種ホルモン濃度を示した. 因に卵胞初期・中期の6mm以下の卵胞より採取した顆粒膜細胞の単層培養系では, P: 8.2ng, E₂: 890pg, 17OHP: 390pg, T: 180pg, 4₄: 340pg/10⁵cells/2days. を示し, これらと比較し growth medium に含有されるホルモンは極めて少量であった. また control と growth medium との間にも濃度差は認められなかつた.

2. 採取顆粒膜細胞の細胞所見

対照卵胞, PCO 卵胞より採取した顆粒膜細胞の Hematoxylin-Eosin 染色所見は, 両者ともに胞体の大きさ10~16 μ で, 細胞質に乏しく, 辺縁はやや不鮮明であつた. 核は円形, 時に楕円形を呈し, 微細顆粒状, 均等分布のクロマチンを有していた.

3. 培養顆粒膜細胞の位相差顕微鏡所見 (写真1)

対照側卵胞および PCO 卵胞由来の顆粒膜細胞は, 両者とも培養3時間前後より culture dish 底

写真1 PCO 卵胞より採取した顆粒膜細胞の培養10日目の位相差顕微鏡所見

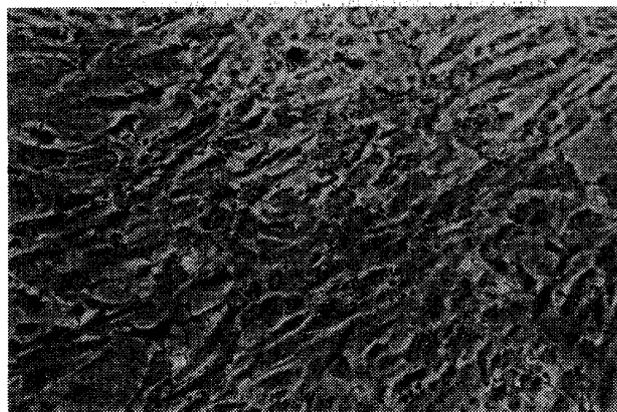
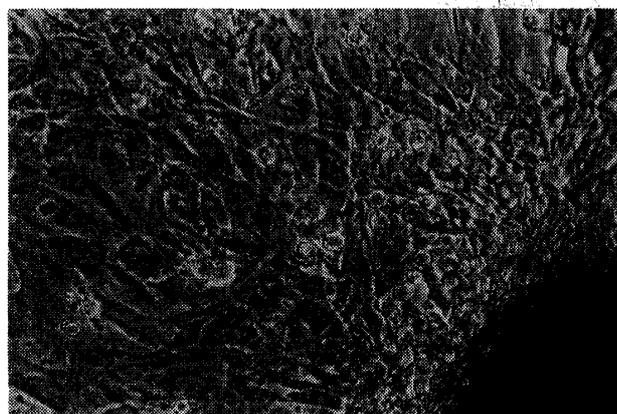


写真2 PCO 卵胞より採取した莖膜組織の培養8日目の位相差顕微鏡所見



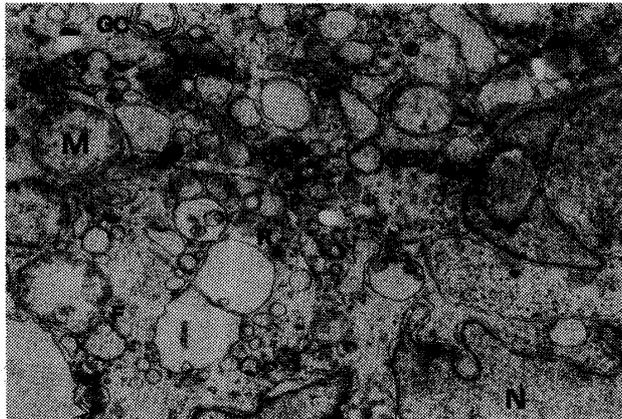
面に付着し始め (viable cell は殆んど6時間以内に付着する), 肥大及び増殖を続けながら, 一部上皮細胞様増殖も見受けられたが, 大部分は線維芽細胞様の発育形態を示した. 培養3日目より12日目迄に脂肪顆粒が散見され, 14日目前後迄細胞分裂を繰返し, 20日目頃より culture dish 面より剝離し始めた.

4. 培養莖膜細胞の位相差顕微鏡所見 (写真2)

莖膜組織は培養36時間頃より culture dish 底面に付着し始め, その後組織片周囲に cell migration が認められた. 培養4日目より組織片周囲に著明な上皮細胞及び線維芽細胞の増殖が見られ, 同心円状の円形コロニーを形成, 培養20日目前後より増殖が認められなくなり, culture dish 面より剝離し始めた. 莖膜組織採取の際, 顆粒膜細胞

写真3 PCO 卵胞より採取した顆粒膜細胞の培養
8日目の透過型電顕所見 (× 18000)

GC: ゴルジ装置, GER: 粗面小胞体, F: fine filament, R: ribosome, P: polyribosome, M: ミトコンドリア



の混在の多い組織片は、その組織学的検索及び培養形態の比較検討の結果、培養6時間前後より culture dish 面に付着し始め、48時間で著明な cell migration が認められる傾向にあつたため、培養2日目に既に円形コロニーを形成している系は、今回の莢膜組織 explant culture 実験より除外した。

5. 培養顆粒膜細胞の透過電顕所見 (写真3)

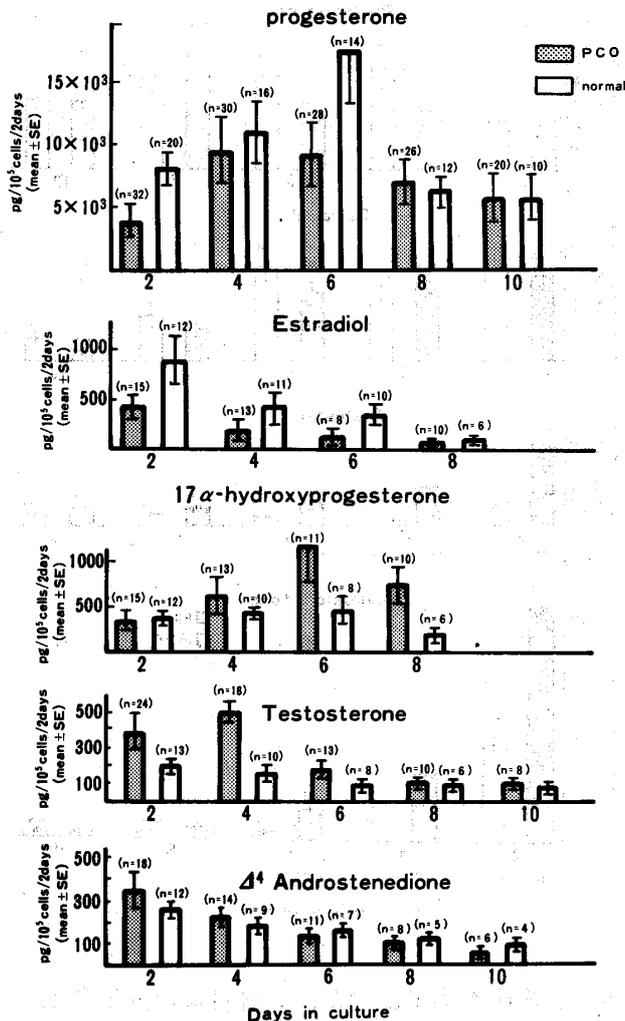
細胞質内には、豊富な ribosome, polyribosome fine filament, 粗面小胞体が認められた。黄体化細胞の特徴¹⁰⁾である滑面小胞体、多数の脂肪顆粒、板状及び絨毛状の cristae を有する電子密度の高いミトコンドリア、肥大したゴルジ装置は、対照卵胞及び PCO 卵胞において共に存在しなかつた。

6. 顆粒膜細胞の単層培養系における steroidogenesis (図1)

1) P分泌

卵胞初期・中期の6mm以下の中小卵胞より採取した顆粒膜細胞のP分泌は、0.1~0.4pg/cell/2daysであつた。これに対し、排卵前期の15mm以上の大卵胞より採取した顆粒膜細胞は、2~4pg/cell/2daysの多量のPを分泌した。PCO卵胞では培養4日目に9.5ng/10⁵cells/2days、対照卵胞では培養6日目に17.5ng/10⁵cells/2daysのP分泌のピークを形成した。培養10日目迄の2日毎のP

図1 Steroidogenesis on monolayer culture of granulosa cells



分泌は、対照卵胞が僅かに高値を呈するが、各々の日時において両者間に有意の差は存在しなかつた。

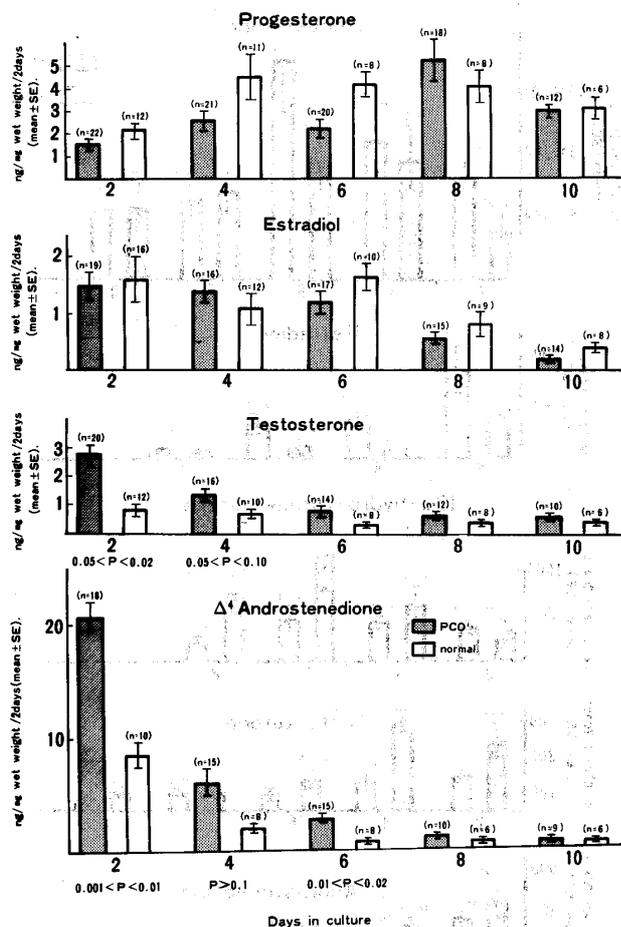
2) 17OHP分泌

PCO卵胞及び対照卵胞共にPの約10分の1の分泌量を示すに過ぎなかつた。培養8日目迄の2日目毎の分泌量の平均は、PCO卵胞750pg/10⁵cells/2days、対照卵胞380pg/10⁵cells/2daysとPCO卵胞が約2倍の分泌量を示すものの、各々の日時においては有意の差は認められなかつた。

3) E₂, E₁分泌

培養顆粒膜細胞におけるE₂分泌は、対照卵胞、PCO卵胞共に少量であり、しかも培養4日目よりその分泌量は急激に低下し、9日目以降は

図2 Steroidogenesis on explant culture of thecal tissue



殆んど検出不能であつた。8日目迄の分泌量は、対照卵胞で高値を示す傾向が認められたが、各々の日時における有意の差は存在しなかつた。尚、 E_1 は PCO 卵胞、対照卵胞両群において、培養2日目より検出不能であつた。

4) androgen (Δ_4 及び T) 分泌

Δ_4 及び T などの androgen 分泌は極めて微量であり、 E_2 や 17OHP 分泌より少量であつた。培養4日目迄、PCO 卵胞が対照卵胞に比し高値を示していたが、経日的な分泌量に有意の差は認められなかつた。

7. 莢膜組織の explant culture 系における steroidogenesis (図2)

1) P 分泌

培養莢膜細胞の P 分泌は、PCO 卵胞では培養8日目に 4.7ng/mg wet weight/2days, 対照卵胞で

は4日目に 4.4ng/mg wet weight/2days の P 分泌のピークを形成し、それら両者の経日的な分泌形式もよく類似していた。

2) E_2 分泌

培養莢膜細胞の E_2 分泌能は、P 分泌量の約2分の1ではあるが、培養顆粒膜細胞に比し、比較的良好に保たれており、両者共に培養6日迄 1.5 ng/mg wet weight/2days 前後の分泌量を示していた。培養8日目よりその分泌量は低下し、11日目以降は検出不能となつた。

3) T 分泌

T 分泌に関しては、対照卵胞より PCO 卵胞に高値の傾向が認められた。特に PCO 卵胞の培養2日目、4日目の T 分泌量は、それぞれ 2.9ng, 1.3ng/mg wet weight/2days と正常卵胞の2~3倍を示した。

4) Δ_4 分泌

卵胞初期・中期の 6mm 以下の対照卵胞及び PCO 卵胞より採取した莢膜組織 explant culture 系において分泌されるステロイドのうち、 Δ_4 分泌は最大であり、PCO 卵胞では Δ_4 分泌亢進の傾向が認められた。特に培養2日目に 22ng/mg wet weight/2days の最大値を取り、2日目と6日目の分泌量は対照卵胞の3~4倍を示し、その分泌量に有意の差が存在した。しかし長期培養に伴い減少傾向を示し、培養8日目以降には両者間の有意の差は認められなくなり、11日目より検出不能となつた。

考 案

卵胞を構成する主要細胞成分である顆粒膜細胞、莢膜細胞、間質細胞の in vitro より見た steroidogenesis の検討は、卵胞の発育成熟、排卵、黄体形成という一連の life span を解明する上で極めて重要であり、PCO の成因を検索する上でも正常卵巣における steroidogenesis との相違を比較検討することが必要となる。

培養系における steroidogenesis の検討に際しては、実験に供した対象、培養方法、培養条件による相違を第一に考慮すべきである。今回の実験で使用した growth medium に含有される各種ホル

モン濃度は、顆粒膜細胞の単層培養系における分泌ステロイドと比較し明らかな相違が認められたこと、及び LH, FSH 値も 1.9mIU/ml 以下であつたことより、培養細胞の steroidogenesis を検討する上で、growth medium 及び培養液中の gonadotropin の影響は本実験系では殆んど無視してよいものと考えられる(表4)。

培養顆粒膜細胞の形態学的特徴に関する各種動物の数多くの知見により、卵胞の採取時期の相違による培養系における発育形態の差異⁵⁾¹⁴⁾が明確にされてきた。排卵前期の大卵胞より採取した顆粒膜細胞では、黄体細胞と極めて類似した細胞により構成される上皮細胞様増殖を呈するのに対し、卵胞初期・中期の中小卵胞では、細胞レベルで殆んど黄体化が見られず、線維芽細胞様の発育形態を示すこと⁸⁾¹⁰⁾が知られている。今回の顆粒膜細胞の単層培養実験では 6mm 以下の中小卵胞を使用したため、他の線維芽細胞との形態学的異同が問題となることが多い。そのため発育形態の比較的類似した腹水中の線維芽細胞を顆粒膜細胞と同様の操作、同条件下で培養した結果、growth medium に含有される各種ステロイド濃度に変動を認めなかつた。これらの結果より、steroidogenic potential を有しない細胞の存在は、培養過程での growth medium のホルモン濃度に如何なる影響も与えないものと推察される。

PCO の病態生理を *in vitro* より考察した知見は極めて少ないが、その組織内含有ステロイドの検討より aromatase deficiency の可能性⁹⁾が唆されている。われわれは PCO の estrogen 動態に関して、末梢血及び卵巣静脈血における E_1 , E_2 レベルが PCO において却つて高値を示すこと、FSH 投与により卵巣静脈血の E_2 値の増加が認められることから、aromatase activity の障害は否定的であると推論¹²⁾¹⁸⁾した。今回の *in vitro* での顆粒膜細胞、莢膜細胞の培養実験において、対照卵胞及び PCO 卵胞の各構成細胞の E_2 分泌に差異は認められなかつた(図1, 2)ことから、卵巣レベルでのそれらの障害は否定できるものと考えられる。PCO に見られる estrogen 高値の状

態に関しては、“extraglandular aromatization of androgen”による E_1 高値に起因するとの知見¹⁹⁾も認められるが、当教室 Kasuga の報告¹²⁾に見られる如く、末梢血中の E_1 , E_2 値は PCO 患者においてほぼ同一であつたことから、末梢血レベルの E_1 の高値による影響も考えにくい。卵巣静脈血の E_1 値は E_2 値の約4分の1であること¹²⁾、今回の培養系における E_1 分泌量も検出不能であることから、卵巣レベルでの E_1 生合成の亢進も否定できるものと考えられる。

卵巣における E_2 の主要生成部位に関しては、顆粒膜細胞であるのか¹⁶⁾、莢膜細胞であるのか⁶⁾、それら両細胞の協調作用によるものであるのか⁴⁾¹⁷⁾、未だ議論の余地は残されている。 E_2 分泌量が動物の種により、卵胞の採取時期、その大きさにより変動することは言うまでもないが、培養顆粒膜細胞の E_2 分泌量は、報告者によりかなりの相違が認められる。培養顆粒膜細胞における主要生成ステロイドは E_2 , P, Δ_4 であり、殊に卵胞後期までは三者の中で E_2 分泌が最大であるとの報告¹³⁾も見られるが、Tに代表される estrogen substrate や、aromatase activity に刺激効果を有する FSH の存在しない状態では、 E_2 分泌は仮にあつたとしても僅かであるという考え方が¹⁶⁾²¹⁾一般的である。著者らの顆粒膜細胞の単層培養系における E_2 分泌量は少量であり、P分泌が長期間持続するのに比し、培養4日目より急激に低下し、9日目以降では検出不能となること(図1)からも、estrogen substrate のない状態では顆粒膜細胞の E_2 生合成能は極めて低いことが推察される。一方、莢膜組織の explant culture 系における E_2 分泌量は、培養期間を通じ比較的よく保たれている(図2)が、莢膜細胞においては顆粒膜細胞に比し、多量の Δ_4 , T などの estrogen substrate の存在が認められるため、これらの結果のみから E_2 の主要産生部位が莢膜細胞であると断定することはできないものと考えられる。

P分泌に関しては、培養細胞の発育形態ならびにその超微形態の差異により、また採取卵胞の月経周期、卵胞の大きさ、healy follicle, atretic

follicle の相違により、培養細胞の P 分泌は大いに变化する⁷⁾¹⁵⁾と考えられている。卵胞後期の healthy follicle と考えられる 15mm 以上の大卵胞より採取した顆粒膜細胞の P 分泌は、2~4pg/cell/2days を示すのに比し、今回の培養実験に使用した卵胞初期・中期の 6mm 以下の卵胞及び PCO 卵胞より採取した顆粒膜細胞では、0.1~0.4pg/cell/2days (図1)と約10分の1程度の P 分泌を示すに過ぎない。また発育形態においては、卵胞中期の卵胞より採取した一部の顆粒膜細胞では上皮細胞様増殖が認められることもあるが、PCO 卵胞、対照卵胞共に大部分は線維芽細胞様増殖を示す(写真1)が多かつた。超微形態でも豊富な粗面小胞体、リボゾームを含み、黄体化細胞の特徴⁹⁾である脂肪顆粒、滑面小胞体は少数であつた(写真3)。これら in vitro における結果を直ちに生体内の卵胞の steroidogenesis に結び付けることは困難であるが、今回の実験より著者らは、trophic hormone (LH, FSH, HCG など)の非存在下における PCO 卵胞、対照卵胞の顆粒膜細胞は、培養系での超微形態を含めたその発育形態並びに P 分泌能を見る限り、差異はないものと推察する。

卵胞における androgen 分泌に関しては、その主要生成部位が莢膜細胞であつて、顆粒膜細胞における androgen 分泌は僅かであると報告¹¹⁾²⁰⁾されている。著者らの顆粒膜細胞の単層培養系の結果においても、 Δ_4 及び T の androgen 分泌は、P, E_2 , 17OHP に比し極めて少量であつた。また PCO 卵胞、対照卵胞両者における分泌量に有意の差が認められないことにより、PCO 患者の末梢血、卵巣静脈血における androgen 比較的高値¹²⁾は、顆粒膜細胞の androgen 分泌異常に起因しないことが判明した。

莢膜組織の explant culture 系における主要生成ステロイドは Δ_4 (図2)であり、PCO 卵胞、対照卵胞共に P, E_2 分泌より有意に高値を示している。殊に PCO 卵胞に見られる培養2日目の T 及び Δ_4 分泌量は、対照卵胞の約3倍であり、有意差をもつて高値を示している。ところが培養

3日目以降その分泌量は急激に低下し、培養7日目になると両者間の androgen 分泌に差異は認められなくなつた。一般に培養実験における各種細胞の steroidogenesis を検討する際、in vivo での種々の内分泌環境に左右されることが多く¹³⁾、培養細胞本来の、steroidogenic potential を見るためには48時間以後の長期培養が必要である。これらの点で PCO 卵胞の培養48時間迄に見られる莢膜組織 explant culture 系における androgen の高値は、in vivo での対照卵胞との内分泌環境の相違が密接に関係しているものと考えられる。つまり PCO 患者にみられる LH 持続的高値が、莢膜組織の形態学的肥厚のみならず、androgen の分泌を促し、その androgen の異常分泌が末梢血、卵巣静脈血の androgen 比較的高値に反映されることが、in vitro の培養実験より推論された。

androgen と P 分泌の間には、莢膜組織 explant culture 系において分泌様式の相違が認められた。培養2日目迄は Δ_4 , T などの androgen 分泌優位の傾向が見られ、P 分泌は Δ_4 の5分の1程度の分泌量を示すに過ぎないが、培養4日目以降 androgen 分泌が急激に減少するにも拘らず、P 分泌は却つて増加傾向を示した。PCO 卵胞、対照卵胞両者に見られるこれらステロイドの分泌形式の解離現象は、McNatty et al. のいう培養細胞の分化¹³⁾、つまり莢膜組織が長期培養を経るにつれ、androgen 分泌優位組織より P 分泌優位組織へ分化した一過程を示していると考えられる。これらの現象は、in vivo での卵胞後期・黄体期における莢膜組織の steroidogenic potential を考察する上で極めて意義深いものである。

以上より、PCO 卵胞および卵胞初期・中期の 6mm 以下の卵胞より採取した顆粒膜細胞は、その培養形態、ホルモン産生能を見る限り両者間に有意の差は認め難く、PCO 卵胞の発育は、正常卵巣に見られる mid-antral follicle のそれにほぼ匹敵するものと考えられる。一方、PCO 卵胞の莢膜細胞では、対照卵胞に比し androgen 分泌亢進の傾向が認められ、LH 持続的高値がその一因であると推察される。われわれは卵巣楔状切除

術前後のホルモン動態を検討¹⁾¹⁸⁾した結果、PCOの成因に関して、卵巣 androgen 増加により LH の分泌異常を来したのではなく、第一次原因は間脳下垂体の機能異常による LH の非周期的分泌亢進にあり、その LH 持続的高値が卵巣の多嚢胞化、白膜肥厚、androgen 分泌亢進を促し、卵巣の PCO 比を助長すると推論しているが、今回の培養系を用いた steroidogenesis の検討からもこの推論の正当性が示唆された。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師飯塚理八教授、ならびに終始御指導下さいました中村幸雄講師に深謝致します。さらに御指導、御協力をいただきました防衛医大薬理学教室今井重之博士ならびに慶応健康相談センター婦人科研究室橘川絹代嬢に感謝致します。

本論文の要旨は第10回国際不妊学会（マドリッド）第53回日本内分泌学会総会にて発表した。また本研究の一部は昭和55年度文部省科学研究費一般研究C No. 557384 および日母おぎやー献金研究補助金によるものであることを付記する。

文 献

1. 飯塚理八, 中村幸雄: 多嚢胞性卵巣. ホルモンと臨床, 22: 802, 1974.
2. 飯塚理八, 中村幸雄: PCO(多嚢胞性卵巣症候群)の術前診断. 産婦人科治療, 30: 351, 1975.
3. Axelrod, L.R. and Goldzieher, J.W.: The polycystic ovary. III Steroid biosynthesis in normal and polycystic ovarian tissue. J. Clin. Endocrinol. Metab., 22: 431, 1962.
4. Batta, S.K., Wentz, A.C. and Channing, C.P.: Steroidogenesis by human ovarian cell types in culture: Influence of mixing of cell types and effect of testosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 50: 274, 1980.
5. Channing, C.P.: Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45: 297, 1969.
6. Channing, C.P. and Coudert, S.P.: The role of granulosa cells and follicular fluid in estrogen secretion by monkey ovary in vivo. Endocrinol., 98: 568, 1976.
7. Channing, C.P.: Progesterone and estrogen secretion by cultured monkey ovarian cell types: Influence of follicular size, serum luteinizing hormone levels, and follicular fluid estrogen levels. Endocrinol., 107: 342, 1980.
8. Crisp, T.M. and Channing, C.P.: Fine structural events correlated with progesterin secretion during luteinization of rhesus monkey granulosa cells in culture. Biol. Reprod., 7: 55, 1972.
9. Devane, G.W., Czekala, N.M., Judo, H.L. and Yen, S.S.C.: Circulating gonadotrophins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease. Am. J. Obstet. Gynecol., 121: 496, 1975.
10. Erickson, G.F., Challis, J.R.G. and Ryan, K.J.: A developmental study on the capacity of rabbit granulosa cells to respond to trophic hormones and secrete progesterone. Develop. Biol., 40: 208, 1974.
11. Fortune, J.E. and Armstrong, D.T.: Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles. Endocrinol., 100: 1341, 1977.
12. Kasuga, Y.: Ovarian steroidogenesis in Japanese patients with polycystic ovary syndrome. Endocrinol. Japon, 27: 541, 1980.
13. McNatty, K.P., Makris, A., DeGrazia, C., Osathanondh, R. and Ryan, K.J.: The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab., 49: 687, 1979.
14. McNatty, K.P. and Sawers, R.S.: Relationship between the endocrine environment within the Graafian follicle and the subsequent rate of progesterone secretion by human granulosa cells in vitro. J. Endocrinol., 66: 391, 1975.
15. McNatty, K.P., Smith, D.M., Makris, A., Osathanondh, R. and Ryan, K.J.: The microenvironment of human antral follicle: Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of oocyte in vivo and in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab., 49: 851, 1979.
16. Moon, Y.S. and Armstrong, D.T.: 17β -estradiol biosynthesis in cultured granulosa and theca cells of human ovarian follicles: Stimulation by follicle-stimulating hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 47: 263, 1977.
17. Moor, R.M.: Sites of steroid production in ovine Graafian follicles in culture. J. Endocrinol., 73: 143, 1977.
18. Nakamura, Y., Bai-Kwann, T., Shimizu, K., Kawamura, N., Tanabe, K. and Iizuka, R.: Hormonal studies before and after wedge resection in Japanese patients with polycystic ovary syndrome (PCO). Keio J. Med., 28: 81, 1979.

19. *Siiteri, P.K. and MacDonald, P.C.*: Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. In: Handbook of Physiol., Section 7, Vol. II: 615, 1973.
20. *Tsang, B.K., Moon, Y.S., Simpson, C.W. and Armstrong, D.T.*: Androgen biosynthesis in human ovarian follicles: Cellular source, gonadotrophic control, and adenocine 3',5'-monophosphate mediation. J. Clin. Endocrinol. Metab., 48: 153, 1979.
21. *Wilson, E.A., Erickson, G.F., Zarutski, P., Finn, A.E., Tulchinsky, D. and Ryan, K.J.*: Endocrine studies of normal and polycystic ovarian tissues in vitro. Am. J. Obstet. Gynecol., 134: 56, 1979.

(特別掲載 No. 4865 昭56・4・10受付)