

多嚢胞性卵巣の steroidogenesis の研究

—卵胞液中内分泌環境と培養顆粒膜細胞の progesterone 分泌能—

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

杉 村 和 男

Studies on Steroidogenesis of Polycystic Ovary Syndrome
—Endocrinological Analysis of Follicular Fluid and Progesterone
Biosynthesis of Cultured Granulosa Cells—

Kazuo SUGIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo
(Director: Prof. Rihachi Iizuka)

概要 多嚢胞性卵巣 (PCO) の本態を解明するため, 正常卵巣の成熟過程における steroidogenesis の変化, 特に顆粒膜細胞をとりまく卵胞液中各種ホルモン濃度の推移, ならびに培養顆粒膜細胞の progesterone (P) 産生能に対する dibutyryl cyclic AMP および LH の作用を PCO と比較検討した。

1) 卵胞液中ホルモン濃度. ① LH は卵巣成熟に従って高値となり, PCO では卵胞期初期, 中期と比較して有意の高値を示した. ② androstenedione (Δ_4), testosterone (T) は卵胞期中期に最高値, 後期に最低値を示し, PCO の Δ_4 は卵胞期各期より有意の高値を呈したが, T に関しては有意差はなかった. ③ estrogen は卵巣成熟と共に増加し, PCO は卵胞期初期とほぼ同様の値を示した. ④ P, FSH, prolactin は, PCO と卵胞期初期, 中期で差はなかった。

2) 顆粒膜細胞培養実験. ① 培養顆粒膜細胞の P 産生能は卵巣成熟に従って増加した. ② LH 添加に対して P 産生能は増加を示すが, 卵巣成熟と共にその反応性は低下した. ③ PCO では, P 産生能は卵胞期中期と同様であったが, LH 添加に対する反応性は低く, 卵胞期後期とほぼ同様であった. ④ dibutyryl cyclic AMP 添加に対する反応性は, PCO と卵胞期初期, 中期で差はなかった。

本研究により, PCO の卵胞液中では LH, Δ_4 が高値を示し, 他のホルモンは卵胞期初期, 中期と差がないことが明らかとなった. 培養顆粒膜細胞は, 卵巣成熟に従って LH 添加に対する反応性が低下するが, これは卵胞液中 LH の濃度差に起因するものと考えられる. また PCO では LH 添加に対する反応性は不良であるが, dibutyryl cyclic AMP に対しては正常卵巣と同様の反応性を示す. よって, PCO の成因に酵素障害は考えにくく, LH の持続的高値, およびその結果としての androgen 分泌の亢進が卵巣の腫大, 多嚢胞化, 白膜の肥厚を促すものと推測される。

Synopsis In order to determine the difference between steroidogenesis in normal and polycystic ovaries (PCO), endocrinological analysis of follicular fluid and monolayer cell culture of human granulosa cells were carried out, and human LH and dibutyryl cyclic AMP were added to the cultures.

1) The concentrations of LH and androstenedione in the follicular fluid from PCO ovaries were significantly higher than those found in normal ovaries in the early and mid-follicular phases.

2) The cultured granulosa cells from the mid-follicular phase of normal women responded significantly to LH, showing an 8 to 10 fold increase in progesterone production. In contrast, exogenous LH caused only a slight stimulation (2 to 4 fold increase) in progesterone production by granulosa cells from PCO follicles.

3) The cultured granulosa cells from normal women and PCO ovaries responded significantly to dibutyryl cyclic AMP, showing an 8 to 10 fold increase in progesterone production.

These results strongly suggest that there is no alteration in the steroidogenic pathway after the cyclic AMP stage and that the persistent elevation of LH in serum and follicular fluid may lead to a disturbance of progesterone production in response to exogenous LH in the cultured granulosa cells from PCO ovaries.

Key words: PCO • Steroidogenesis • Follicular fluid • Culture • Granulosa cell

緒 言

顆粒膜細胞は卵胞を構成する主要細胞成分であり, oocyte と共に卵胞中の avascular region に存在し, 末梢血中とは異なつた内分泌環境に置かれている。顆粒膜細胞の steroidogenic potential および成熟は, 末梢血中よりもむしろ卵胞液中の gonadotropin および steroid ホルモンに直接的影響を受けるため, 卵胞液中各種ホルモン濃度の推移を検討することは, 卵胞の成熟過程を解明する上で, 重要な意義を持つものと考えられる。

Stein-Leventhal syndrome は白膜の肥厚, 両側卵巣の腫大, 多嚢胞化を認め, 男性化徴候, 排卵障害を伴うことにより不妊を呈する極めて興味ある疾患であり, 1935年に Stein and Leventhal¹²⁾により報告された。しかし, 本邦では欧米の報告⁷⁾¹²⁾¹³⁾に見られる程の多毛等の男性化を示す症例や, 高度の肥満を伴う症例は少なく, 本邦では卵巣の多嚢胞化, 無排卵, 不妊を呈するものを多嚢胞性卵巣症候群 (PCO) と呼んでいる。

われわれは PCO の steroidogenesis に関し, ①卵巣静脈血中ホルモン濃度⁸⁾, および培養顆粒膜細胞の細胞レベルでの steroid 産生能の検討³⁾より, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase ならびに aromatizing enzyme の障害は存在しないか, あるとしてもごく軽微である。②莢膜細胞培養実験³⁾, および卵巣楔状切除術前後のホルモン動態の検討¹⁾²⁾¹⁰⁾より, PCO の成因は LH の持続的分泌亢進にあり, 莢膜細胞よりの androgen 分泌増加はその結果である, と推論している。

今回, 正常月経周期を有する婦人の卵巣より卵胞期各時期の顆粒膜細胞を採取し, その培養顆粒膜細胞の持つ主要な steroidogenic potential である P 産生能と, 卵胞液中および末梢血中の内分泌環境を総合的に検討し, 卵胞成熟過程における顆粒膜細胞, 卵胞液の持つ意義について考察を加えた。また, PCO の培養顆粒膜細胞の持つ P 産生能の検索を通じ, PCO の病態を解明することを目的とした。

実験材料ならびに方法

1. 実験対象

正常卵巣32例は子宮筋腫, 子宮頸癌等の婦人科

疾患で開腹手術を施行した26歳から45歳までの正常月経周期を有する症例で, 卵胞期初期, 中期, 後期のものを用いた。PCO14例は飯塚・中村の診断基準^{1)~3)}を満たす24歳から39歳までの症例に, 卵巣楔状切除術を行つた際に検体を採取した。月経周期は26日から30日型の症例を用い, 最終月経開始初日から5日目までを初期, 6日目から10日目までを中期, 11日目以降を後期とし, 基礎体温表, 子宮内膜日付診, 末梢血中 LH, FSH, estradiol (E_2), P 値を参考とした。

2. 培養器具ならびに培養条件

培養容器は Falcon の tissue culture dish 35×10mm (#3001) を用いた。培養液は DIFCO の TC199 に GIBCO の fetal calf serum (FCS) を 20%, penicillin 100IU/ml, streptomycin 100 μ g/ml の割合で加えたものを使用した。pH は 7.0~7.2 とし, 培養条件は 37°C, 95%—air, 5%—CO₂ とした。

3. 顆粒膜細胞の培養方法

採取した卵胞液中の顆粒膜細胞は滅菌試験管に保存し, 実験室へ輸送の際は 4°C に保ち, 採取後 2 時間以内に実験に供した。顆粒膜細胞の培養方法は, 教室の吉村³⁾¹⁴⁾の方法に準じた。

卵胞液を保存した滅菌試験管を 600g にて 10 分間遠沈, 卵胞液を吸引分離して TC199 を加え, ピペetting にて顆粒膜細胞を分離拡散した。卵除去後, 細胞数を算定, 20%FCS 添加 TC 199 にて 12 日間培養した。細胞数は medium 1ml につき 10⁵ cells とし, dish 1 個あたりに 2ml ずつ medium を加えた。medium は 2 日毎に全量交換し, -20°C にて凍結保存して, 後に radioimmunoassay (RIA) に供した。分離した卵胞液, および手術時に採取した末梢血より分離した血清も同様に -20°C にて凍結保存し, 測定に供した。

4. 添加試薬

human LH (LH) は NIADDK より提供された hLH-I-2 (AFP-6332-B) 13117IU/mg を, また dibutyryl cyclic AMP ((Bu)₂cAMP) は, 第一製薬より提供された lot. No. 1183-PEJ をそれぞれ medium にて適宜希釈し, 培養 2 日目より medium 中へ添加した。

5. ホルモン測定

凍結保存した medium 中の, 顆粒膜細胞より放出された P, および卵胞液, 末梢血中の LH, FSH, prolactin (PRL), P, estrone (E_1), E_2 , Δ_4 , T の濃度を RIA⁸⁾¹⁰⁾にて測定した. また steroid ホルモンの Free と Bound の分離には, dextran coated charcoal 法を用いた.

実験成績

1. 卵胞液中および末梢血中ホルモン濃度

1) LH (表1, 2)

卵胞液中 LH 濃度は, 卵胞期初期 3.57 ± 0.36 mIU/ml, 中期 5.18 ± 0.49 mIU/ml, 後期 10.2 ± 1.6 mIU/ml と, 末梢血中 LH 濃度の上昇に伴って高値となる傾向を示した. また, PCO では 13.5 ± 1.4 mIU/ml と, 卵胞期初期, 中期と比較して有意 ($p < 0.001$) の高値を示し, 卵胞期後期とほぼ同様の値であつた.

末梢血中では, 卵胞期初期 6.97 ± 1.61 mIU/ml, 中期 8.13 ± 1.47 mIU/ml に対し, PCO は $25.4 \pm$

2.5 mIU/ml と, 卵胞液中と同様に有意 ($p < 0.001$) の高値を示した.

卵胞液中では, LH の測定限界の 1.9 mIU/ml 未満のものが, 卵胞期初期で22%, 中期で8%存在した. 表1は 1.9 mIU/ml 未満の症例をすべて 1.9 mIU/ml として計算した.

2) FSH

卵胞液中 FSH 値も LH 同様, 末梢血中 FSH 濃度が上昇するに従って高値となる傾向を示した. また PCO は, 卵胞液中, 末梢血中とも, 卵胞期各期のいずれの時期に対しても有意差を認めなかつた (表1, 2).

卵胞液中では, FSH の測定限界の 1.9 mIU/ml 未満のものが卵胞期初期で88%, 中期で45%, 後期で50%, PCO では13%存在した. 表1は卵胞期初期は測定限界未満とし, 他の時期および PCO では 1.9 mIU/ml 未満の症例をすべて 1.9 mIU/ml として計算した.

3) PRL

表1 卵胞液中ホルモン濃度 (mean $\pm$ S.E.)

	正 常 卵 胞 期			P C O
	初 期	中 期	後 期	
LH (mIU/ml)	$3.57 \pm 0.36^{***}$ (n = 9)	$5.18 \pm 0.49^{***}$ (n = 12)	10.2 ± 1.6 (n = 15)	13.5 ± 1.4 (n = 18)
FSH (mIU/ml)	測定限界未満 (n = 8)	2.36 ± 0.24 (n = 11)	4.92 ± 0.93 (n = 18)	3.15 ± 0.32 (n = 16)
PRL (ng/ml)	18.0 ± 1.1 (n = 8)	22.6 ± 1.8 (n = 9)	$29.8 \pm 4.4^*$ (n = 17)	16.7 ± 2.7 (n = 11)
P (ng/ml)	86.9 ± 17.3 (n = 11)	260 ± 61 (n = 8)	$3080 \pm 1530^*$ (n = 11)	99.7 ± 10.6 (n = 20)
E_1 (ng/ml)	43.9 ± 14.6 (n = 9)	61.0 ± 17.7 (n = 9)	92.7 ± 13.3 (n = 9)	37.2 ± 18.9 (n = 21)
E_2 (ng/ml)	166 ± 49 (n = 11)	505 ± 139 (n = 8)	$1400 \pm 266^{**}$ (n = 13)	156 ± 82 (n = 29)
Δ_4 (ng/ml)	$675 \pm 131^{***}$ (n = 9)	$742 \pm 164^{**}$ (n = 9)	$594 \pm 186^{***}$ (n = 9)	1320 ± 87 (n = 28)
T (ng/ml)	33.6 ± 6.0 (n = 9)	48.0 ± 7.7 (n = 9)	$27.6 \pm 8.2^*$ (n = 9)	68.7 ± 9.9 (n = 28)

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (PCO との有意差)

表2 末梢血中ホルモン濃度 (mean $\pm$ S.E.)

	正 常 卵 胞 期			P C O
	初 期	中 期	後 期	
LH (mIU/ml)	$6.97 \pm 1.61^{***}$ (n = 7)	$8.13 \pm 1.47^{***}$ (n = 7)	$64.7 \pm 22.8^*$ (n = 8)	25.4 ± 2.5 (n = 14)
FSH (mIU/ml)	5.53 ± 0.83 (n = 7)	7.03 ± 1.04 (n = 7)	18.2 ± 7.0 (n = 8)	7.14 ± 0.48 (n = 14)
PRL (ng/ml)	81.5 ± 21.8 (n = 6)	73.3 ± 16.7 (n = 8)	89.3 ± 17.7 (n = 9)	65.0 ± 6.9 (n = 13)
P (ng/ml)	0.87 ± 0.15 (n = 6)	1.03 ± 0.10 (n = 7)	$2.49 \pm 0.41^{***}$ (n = 9)	0.79 ± 0.14 (n = 14)
E_1 (pg/ml)	183 ± 13 (n = 6)	224 ± 38 (n = 6)	$654 \pm 234^*$ (n = 8)	220 ± 13 (n = 14)
E_2 (pg/ml)	88.9 ± 7.8 (n = 6)	124 ± 28 (n = 7)	$291 \pm 27^{***}$ (n = 9)	113 ± 14 (n = 14)
Δ_4 (ng/ml)	$1.64 \pm 0.19^{**}$ (n = 6)	$1.84 \pm 0.31^*$ (n = 6)	2.47 ± 0.54 (n = 9)	2.81 ± 0.25 (n = 14)
T (ng/ml)	$0.38 \pm 0.02^*$ (n = 6)	0.59 ± 0.12 (n = 6)	1.03 ± 0.24 (n = 9)	0.76 ± 0.09 (n = 14)

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (PCO との有意差)

PRLは卵胞液中では、卵胞期初期 18.0 ± 1.1 ng/ml, 中期 22.6 ± 1.8 ng/ml, 後期 29.8 ± 4.4 ng/mlと、卵胞の発育に従って増加する傾向を示した。PCOの卵胞液中PRL濃度は 16.7 ± 2.7 ng/mlで、卵胞期初期、中期と比較して有意差は存在せず、また末梢血中においても同様に有意差は認められなかった(表1, 2)。

手術前日の末梢血中PRL濃度は正常卵胞期 14.3 ± 3.8 ng/ml (n=21), PCO 15.5 ± 4.6 ng/ml (n=13)と30 ng/ml以下の正常範囲内であつたが、術中の末梢血中PRL値は、卵胞期初期 81.5 ± 21.8 ng/ml, 中期 73.3 ± 16.7 ng/ml, 後期 89.3 ± 17.7 ng/ml, PCO 65.0 ± 6.9 ng/mlとそれぞれ高値を示した。

4) P

Pは卵胞液中で、卵胞期初期 86.9 ± 17.3 ng/ml, 中期 260 ± 61 ng/ml, 後期 3080 ± 1530 ng/mlと、卵胞成熟に伴って増加した。PCOの卵胞液中P濃度は、 99.7 ± 10.6 ng/mlで、卵胞期初期とほぼ同様の値を示し、卵胞期中期とも有意差は認められなかった(表1)。

末梢血中P濃度は、卵胞期初期 0.87 ± 0.15 ng/ml, 中期 1.03 ± 0.10 ng/mlに対し、PCOは 0.79 ± 0.14 ng/mlと有意差は存在せず、末梢血中においてもPCOは卵胞期初期とほぼ同様の値を示した(表2)。

5) E₁

卵胞液中E₁濃度は、卵胞期初期 43.9 ± 14.6 ng/ml, 中期 61.0 ± 17.7 ng/ml, 後期 92.7 ± 13.3 ng/mlと、卵胞成熟に従って増加する傾向を示した。PCOでは、 37.2 ± 18.9 ng/mlと卵胞期各期との有意差は認められず、卵胞期初期とほぼ同様の値であつた(表1)。

末梢血中E₁濃度は、卵胞期初期 183 ± 13 pg/ml, 中期 224 ± 38 pg/ml, 後期 654 ± 234 pg/mlに対し、PCOでは 220 ± 13 pg/mlと卵胞期中期とほぼ同様の値を示し、卵胞期初期よりやや高値であつたが有意差は認められなかった(表2)。

6) E₂

卵胞液中E₂濃度は、卵胞期初期 166 ± 49 ng/ml, 中期 505 ± 139 ng/ml, 後期 1400 ± 266 ng/mlと、卵

胞成熟に伴って増加を示した。PCOでは 156 ± 82 ng/mlと、卵胞期初期とほぼ同様の値を示し、卵胞期中期とも有意差は認められなかった(表1)。

末梢血中E₂濃度は、卵胞期初期 88.9 ± 7.8 pg/ml, 中期 124 ± 28 pg/ml, 後期 291 ± 27 pg/ml, PCO 113 ± 14 pg/mlと、E₁同様PCOは卵胞期初期よりやや高値で卵胞期中期とほぼ同様の値を示したが、卵胞期初期との有意差は認められなかった(表2)。

7) Δ₄

Δ₄の卵胞液中濃度は、卵胞期初期 675 ± 131 ng/ml, 中期 742 ± 164 ng/ml, 後期 594 ± 186 ng/mlと、卵胞期中期に最も高く、卵胞期後期には低下する傾向を示した。PCOでは 1320 ± 87 ng/mlで、これは卵胞期初期、中期、後期と比較して有意(p<0.001, p<0.01, p<0.001)の高値であつた(表1)。

末梢血中Δ₄濃度は卵胞液中Δ₄濃度の推移とは異なり、卵胞期初期 1.64 ± 0.19 ng/ml, 中期 1.84 ± 0.31 ng/ml, 後期 2.47 ± 0.54 ng/mlと、卵胞成熟に伴う増加傾向が見られた。PCOでは 2.81 ± 0.25 ng/mlと卵胞期後期とほぼ同様の値を示し、卵胞期初期、中期と比較して有意(p<0.01, p<0.05)の高値を示した(表2)。

8) T

卵胞液中T濃度は、卵胞期初期 33.6 ± 6.0 ng/ml, 中期 48.0 ± 7.7 ng/ml, 後期 27.6 ± 8.2 ng/mlと、Δ₄と同様に推移する傾向を示した。一方PCOでは 68.7 ± 9.9 ng/mlと、卵胞期各期より高値を示したが、卵胞期初期、中期との有意差は認められなかった(表1)。

末梢血中T濃度は、卵胞期初期 0.38 ± 0.02 ng/ml, 中期 0.59 ± 0.12 ng/ml, 後期 1.03 ± 0.24 ng/mlと、卵胞液中T濃度の推移とは異なり、卵胞成熟に伴って増加する傾向を認めた。PCOでは 0.76 ± 0.09 ng/mlと、卵胞期初期と比較して有意(p<0.05)の高値を呈した(表2)。

2. 培養顆粒膜細胞

1) 形態

正常卵胞期およびPCOより採取した顆粒膜細胞は、両者とも培養開始後約3時間よりdishの底

面に付着し始め、上皮細胞様増殖または線維芽細胞様の発育形態を示した。この培養顆粒膜細胞の発育形態の差異は、採取の時期によることが多く、卵胞期後期より採取したものは上皮細胞様の発育形態（写真1）を、卵胞期初期、中期およびPCOより採取したものは線維芽細胞様の発育形態（写真2）をとる傾向が見られた。

2) LH 添加に対する反応性

培養顆粒膜細胞へ LH を添加した場合、P 分泌に対する LH の至適濃度は100ng/ml であり、培養2日目より添加するとその反応性は6日目に最

写真1 卵胞期後期より採取した培養8日目の顆粒膜細胞の位相差顕微鏡所見

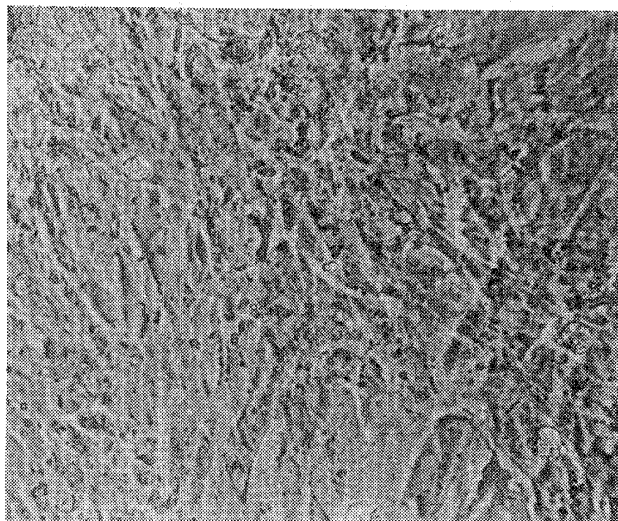


写真2 PCOより採取した培養6日目の顆粒膜細胞の位相差顕微鏡所見

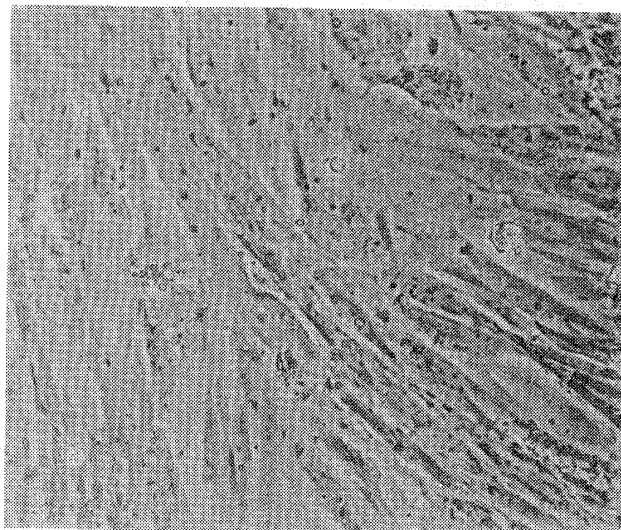
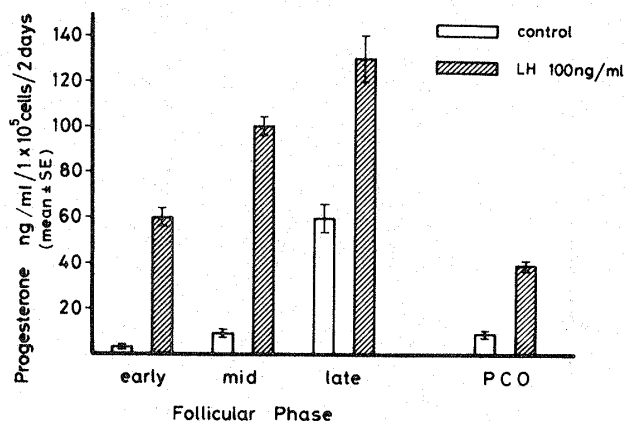


図1 Progesterone production by the cultured granulosa cells with or without exogenous LH



大であつた、と教室の Yoshimura et al.¹⁴⁾は報告している。そこで、卵胞期各期の正常卵巣およびPCOより採取した培養顆粒膜細胞へ、LH100ng/mlを培養2日目より添加し、培養6日目のmedium中のP濃度をLH添加群とLH非添加群(control)で比較した(図1)。

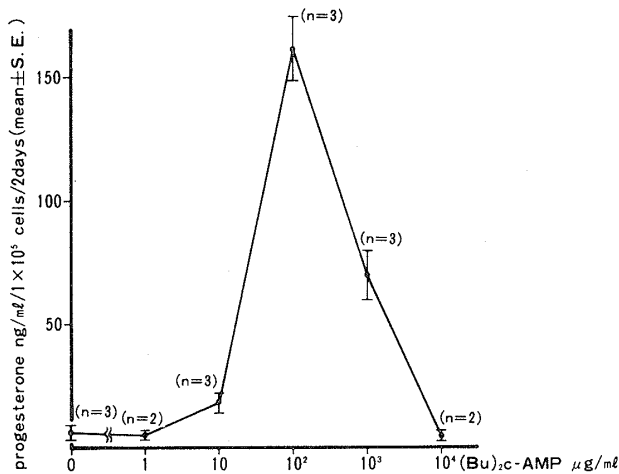
卵胞期初期では、LH非添加群の培養6日目の値 $3.56 \pm 0.79 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ に対し、LH 100ng/ml添加群の培養6日目の値は $59.7 \pm 7.6 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ と、15~20倍のP分泌増加を認めた。卵胞期中期ではLH非添加群の $9.13 \pm 4.07 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ と比較してLH添加群は $100 \pm 8 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ と、8~10倍のP分泌増加を示した。また、卵胞期後期になると、LH非添加群の $60.6 \pm 12.4 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ に比し、LH添加群は $131 \pm 22 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ と、2~3倍のP分泌増加を認めるのみであつた。以上の様に正常卵胞期では卵胞成熟に伴ってその培養顆粒膜細胞のP分泌能は増加するが、LH添加に対する反応性は逆に低下する傾向が認められた。

一方PCOではLH非添加群の $9.76 \pm 3.96 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ と比較して、添加群は $38.7 \pm 4.2 \text{ ng/ml/}1 \times 10^5 \text{ cells/2 days}$ と、卵胞期後期とほぼ同様の2~4倍のP分泌増加を認めるのみであつた。

3) (Bu)₂ cAMP の至適濃度

卵胞期中期の卵胞より採取した培養顆粒膜細胞へ、培養2日目より $1 \mu\text{g/ml}$ から $10^4 \mu\text{g/ml}$ までの

図2 Dose response of $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ in progesterone production by granulosa cells



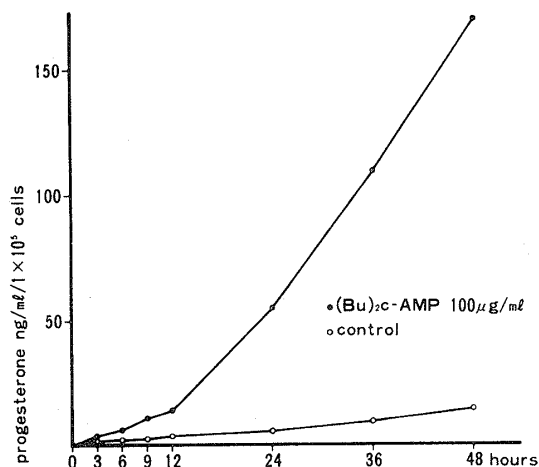
各濃度の $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ を添加し, medium 中へ放出される P の濃度を培養 6 日目の値で検討した (図 2).

$(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ は $10\mu\text{g/ml}$ から P 分泌刺激効果を有しており, 最大有効濃度は $100\mu\text{g/ml}$ で, $163\pm 35\text{ng/ml}/1\times 10^5\text{ cells}/2\text{ days}$ の P 分泌を認めた. そこで $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ の至適濃度は $100\mu\text{g/ml}$ とし, 以下この濃度にて実験を行つた.

4) $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ 添加に対する P 分泌の経時的变化

培養 6 日目の正常卵胞期中期の培養顆粒膜細胞へ $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ $100\mu\text{g/ml}$ を添加し, 添加後 48 時間までの medium 中の P 濃度の経時的变化を検討した (図 3).

図3 Effect of $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ in progesterone production by granulosa cells in 48 hours



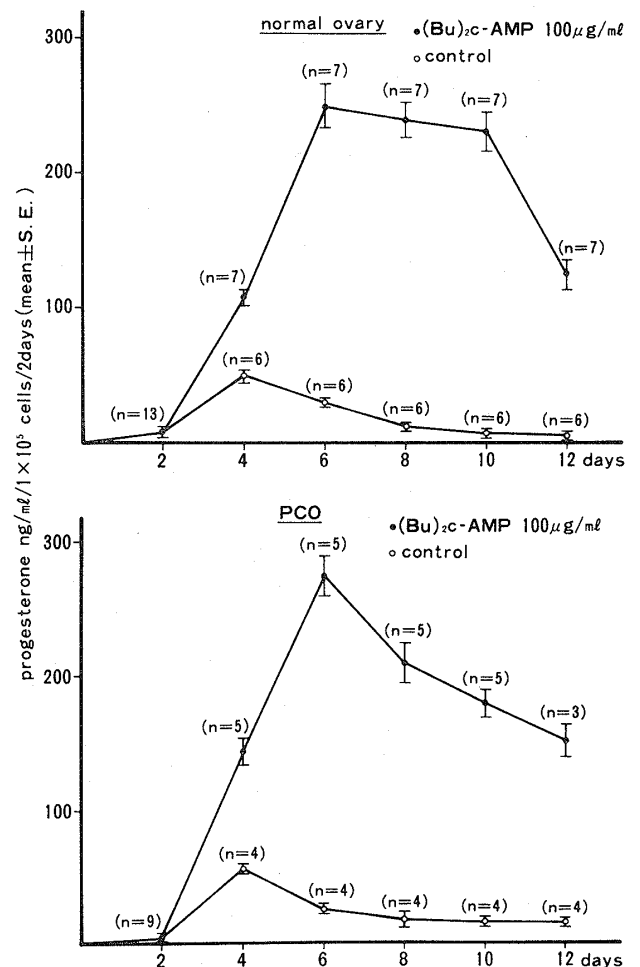
medium 中の P 濃度は $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ 添加群, 非添加群とも 48 時間まではほぼ直線的増加を示した. また, 48 時間以降 medium を交換せず, P 分泌の経時的变化を観察した場合, $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ 添加群の顆粒膜細胞に細胞増殖の抑制および細胞死滅傾向が見られたため, medium の交換は 2 日毎が本実験には最適であると考えられた.

5) $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ 添加に対する反応性

卵胞期初期, 中期の正常卵巣および PCO より採取した培養顆粒膜細胞へ, 2 日目より $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ $100\mu\text{g/ml}$ を添加した場合の medium 中の P 濃度の変化を検討した (図 4).

正常卵巣の $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ 添加群は, 培養 6 日目に $249\pm 36\text{ng/ml}/1\times 10^5\text{ cells}/2\text{ days}$ と P 分泌のピークを示し, 非添加群の 6 日目 $31.4\pm 4.4\text{ng}/$

図4 Progesterone production by granulosa cells of normal ovary and PCO in the presence or absence of $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$



ml/ 1×10^5 cells/2 days と比較して、8～10倍の P 分泌の増加を認めた。

PCO では、添加群の 6 日目の値は 277 ± 40 ng/ml/ 1×10^5 cells/2 days で、非添加群の 6 日目 26.1 ± 3.6 ng/ml/ 1×10^5 cells/2 days に比し、8～12倍の P 分泌増加を認め、正常卵巢と PCO における (Bu) $_2$ cAMP の有する P 分泌刺激効果は、その反応性および経日的分泌形式も同一であった。

考 案

顆粒膜細胞は、莢膜細胞とともに卵胞を構成し、steroidogenic potential を有する主要成分であり、その顆粒膜細胞へ直接影響をおよぼす卵胞液中の内分泌環境を検索することは、卵胞の成熟過程および PCO と正常卵巢の steroidogenesis の相違を検討する上で、重要な意義を持つものと考えられる。PCO を正常卵巢と比較する際は、gonadotropin および steroid ホルモンレベルの変動が最も少ない卵胞期初期との比較を行うべきである⁶⁾が、卵胞期初期は採取される顆粒膜細胞の細胞数に制限があるため、本実験では卵胞液中の内分泌環境および顆粒膜細胞の培養実験とも、卵胞期初期、中期両者との比較を行った。

PCO の卵胞液中ホルモン濃度は、手術症例数が少ないこと、および個々の卵胞に存在する卵胞液の量に制限のあることより報告は少なく、特に下垂体ホルモンを測定した知見⁴⁾⁹⁾は極めて少ない。本実験では卵胞液中の LH, FSH, PRL の 3 種類の下垂体ホルモンを測定したが、卵胞液中の下垂体ホルモン濃度は他の知見⁹⁾同様、末梢血中の値の約 15% から 50% の濃度を示し、個々の症例においても、卵胞液中の値の方が高値を示した症例は 1 例も存在しなかった。このことより、下垂体ホルモンの卵胞内への取り込み機構は、active な取り込みではなく、濃度勾配による passive な取り込み機構であると推測される。McNatty⁹⁾によると、卵胞期初期、中期の卵胞液中では、LH および FSH (特に LH) は測定限界未満のものが多くとしている。McNatty は卵胞液中下垂体ホルモンの測定には、卵胞液の希釈液を用いているものと推測されるが、本実験ではすべて卵胞液原液を測

定した。その結果、FSH 値は測定限界 (1.9 mIU/ml) 未満のものが 42% 認められたが、LH 値は 94% が測定限界 (1.9 mIU/ml) 以上であった。

LH は卵胞液中においても末梢血中と同様、卵胞期初期、中期、後期と卵胞が成熟するに従って高値を示した。PCO では卵胞液中 LH は、卵胞期初期、中期と比較して有意 ($p < 0.001$) の高値を示し、卵胞期後期とほぼ同様の値であった。われわれは一連の研究により PCO の成因は、間脳下垂体系の機能異常による LH の持続的分泌亢進であると推論してきた^{1)~3)10)14)}が、その LH の持続的高値は末梢血中のみならず、顆粒膜細胞を直接とりまく卵胞液中においても存在することが明らかとなった。

PCO の成因には、FSH 分泌低下、および LH/FSH ratio の増加が卵胞成熟、特に顆粒膜細胞の成熟の抑制に関与する⁴⁾⁷⁾¹³⁾とされているが、PCO 由来の培養顆粒膜細胞の超微形態を含めた発育形態³⁾および steroid 分泌能¹⁴⁾、また卵胞液中の FSH 濃度に関し、卵胞期中期の正常卵胞との間に差異を認めなかったことより、その FSH の関与は第一次原因とは考えにくい。

卵胞液中 PRL 濃度は、卵胞期初期に最も高値を示し、中期、後期と卵胞が成熟するに従って低値を示すとの報告⁹⁾もあるが、本実験では全く逆に卵胞期初期で最も低く、中期、後期と成熟するに従って高値となる傾向を示した。術中の末梢血中 PRL 値は他の知見⁹⁾同様、術前の値より高値を示したが、これは麻酔および手術のストレスによるものと考えられる。近年、PCO の成因に PRL が関与するとの説も見られるが、卵胞液中および末梢血中 PRL 濃度は、PCO と正常卵胞期初期、中期で全く有意差を認めない点より、すでに中村ら²⁾が主張しているように、PRL の関与は否定的である。

卵胞液中 P 濃度は、卵胞期初期、中期、後期と卵胞成熟に従って高値を示すが、これは正常卵胞期より採取された培養顆粒膜細胞の細胞レベルでの P 分泌能が卵胞成熟に伴って上昇すること (図 1)、および採取される顆粒膜細胞の細胞数も卵胞成熟に従って増加することより、顆粒膜細胞の質

的および量的成熟を反映しているものと考えられる。PCOの卵胞液中および末梢血中のP濃度は、卵胞期初期とほぼ同様の値であつたことより、*in vivo*において、PCOは卵胞期初期とほぼ同様のP産生能を持つものと推測される。

卵胞液中 androgen 濃度は他の知見⁹⁾にも見られる様に、卵胞期中期で最高値を、卵胞期後期に最低値を示した。これは androgen が steroidogenesis の中間代謝産物であり、卵胞の成熟に伴う顆粒膜細胞の細胞数の増加、および aromatizing activity の上昇により、estrogen への aromatization が卵胞期後期に最大となるためと推測される。培養顆粒膜細胞の androgen 分泌は非常に少量であるのに反し、培養莢膜細胞が多量の androgen を分泌すること³⁾より、androgen の主要産生部位は莢膜細胞であると考えられている。これらの結果より、PCOの卵胞液中の hyper-androgenism の状態は、LH の持続的高値による莢膜細胞の hyperfunction に起因すると推察される。

近年、PCOではestrogenは高値であり、これは androgen の extraglandular conversion による E_1 高値が関与しているとの知見¹³⁾があるが、本実験において、PCOの末梢血中 estrogen 濃度は卵胞期中期とほぼ同様に卵胞期初期よりわずかに高値を示すが有意差は認められなかつたこと、および末梢血中 E_1/E_2 比は、卵胞期初期： 2.05 ± 0.31 、中期： 2.32 ± 0.64 、後期： 2.29 ± 0.68 に対し、PCO： 2.19 ± 0.18 と全く差異を認めないこと、また本邦のPCOでは高度の肥満を伴う症例は少なく、extraglandular aromatization の場となる脂肪組織が欧米の症例ほど多量には存在しないことより、本邦のPCO症例では、extraglandular conversion の概念は否定的である。われわれはPCOにおけるestrogen分泌に関する一連の研究により、卵巣静脈血中で E_1 、 E_2 が正常卵巣より高値を示すこと⁸⁾、培養顆粒膜細胞および培養莢膜細胞の E_2 分泌は正常卵巣と差を認めなかつたこと³⁾より、aromatizing enzyme の障害を否定しているが、今回本実験で卵胞液中 E_1 、 E_2 濃度もPCOと正常卵胞期初期、中期で有意差のないことより、

この結論の正当性が示唆された。

培養顆粒膜細胞のP分泌に関しては、外因性のホルモン非添加の状況下では、PCOは正常卵胞期中期と全く同様のP分泌能を有していた。培養顆粒膜細胞へLHを添加した場合、顆粒膜細胞のLH receptorを介してadenyl cyclase活性を高めることにより細胞内cyclic AMPを増加させ、それをsecond messengerとしてホルモン作用を現わすと考えられる。Channing⁵⁾は、ブタ顆粒膜細胞を用いた実験で、血中低LH濃度の時期に採取した培養顆粒膜細胞は、basalのP分泌は低値であるが、LH添加に対するP分泌増加の反応性は良好であり、また血中高LH濃度の時期に採取した培養顆粒膜細胞は、basalのP分泌は高値であるが、LH添加に対する反応性は不良であつたと報告している。本実験においても卵胞期初期、中期、後期と卵胞液中および末梢血中LH値が高値を呈するに従い、培養顆粒膜細胞のbasalのP分泌は増加を示すが、外因性LH添加に対するP分泌増加の反応性は、逆に低下する傾向が認められた。PCOにおける卵胞液中LH濃度は卵胞期後期と同様に、卵胞期初期、中期より有意 ($p < 0.001$) の高値を示し、PCO由来の培養顆粒膜細胞は、外因性LHに対する反応性が低下しているものと考えられる。

(Bu)₂cAMPはcyclic AMPの誘導体で、細胞膜を通過し、protein kinaseの活性化、protein kinaseによる種々のタンパクのリン酸化を通じてホルモン作用を現わすとされており、培養顆粒膜細胞のP分泌に関し、刺激効果を有している。PCO由来の培養顆粒膜細胞は、(Bu)₂cAMP添加に対して正常卵巣と全く同様のP分泌増加の反応性を示していることより、PCOの顆粒膜細胞の細胞内レベルでは、P分泌の一連のsteroidogenesisに関し、障害はないものと考えられる。

これら一連の培養実験より、PCOと正常卵巣の培養顆粒膜細胞のLH添加に対するP分泌の反応性の差異は、PCOに存在する卵胞液中および末梢血中のLHの持続的高値により、顆粒膜細胞のLH receptorのsaturationあるいはdown regulationによるavailable siteの減少¹¹⁾に起因する

ものと推測される。

以上の結果より、卵胞期の正常卵胞では、卵胞成熟に伴う顆粒膜細胞の細胞数の増加、および末梢血中 gonadotropin 濃度の上昇による卵胞液中 gonadotropin 濃度の増加が見られ、これに伴う P 分泌および androgen から estrogen への aromatization の増加の結果、卵胞液中 P, E₁, E₂ 値は卵胞成熟と共に上昇するものと考えられる。PCO と正常卵巣の内分泌環境の差異は、末梢血中の LH の持続的高値に起因する卵胞液中の LH の持続的高値、および莢膜細胞の hyperfunction による Δ_4 の高値であり、その LH の持続的高値が PCO と正常卵巣の培養顆粒膜細胞の LH に対する反応性に差異を与えるものと考えられる。PCO と正常卵巣の培養顆粒膜細胞は (Bu)₂cAMP に対しては全く同様の反応性を示すことより、PCO の成因に関して酵素障害説は否定的であり、LH の持続的高値、およびその結果としての androgen 分泌の亢進が卵巣の腫大、多嚢胞化、白膜の肥厚を促すものと推測される。

稿を終るに際し、終始御懇篤なる御指導、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いただき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します。また LH、および (Bu)₂cAMP を快く提供して頂いた National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases と第一製薬に深謝致します。また、多忙なる日常診療にもかかわらず検体採取に快く御協力いただきました荘病院、荻窪病院、練馬総合病院の産婦人科諸兄姉に感謝致します。

本論文の要旨は、第54回日本内分泌学会秋季大会、第55回日本内分泌学会総会、第56回日本内分泌学会秋季大会、第10回世界産婦人科学会 (San Francisco) にて発表した。また、本研究の一部は、昭和58年度文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) 58771095 および、56年度～58年度一般研究 (B) 56480281 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: PCO (多嚢胞性卵巣症候群) の術前診断. 産婦人科治療, 30: 351, 1975.

2. 中村幸雄, 片山恵利子, 荘司延三: PCO (多嚢胞性卵巣症候群). 産婦の実際, 31: 379, 1982.
3. 吉村泰典: 組織培養法による顆粒膜細胞, 莢膜組織の steroidogenesis の研究. 日産婦誌, 33: 1005, 1980.
4. Baird, D.T.: Polycystic ovary syndrome. In: Advances in gynaecological endocrinology (ed. H.S. Jacobes), 289. RCOG, London, 1978.
5. Channing, C.P.: Relationship between serum luteinizing hormone levels and the ability of porcine granulosa cells to luteinize and respond to exogenous luteinizing hormone in culture. Endocrinol., 106: 317, 1980.
6. DeVane, G.W., Czekala, N.M., Judd, H.L. and Yen, S.S.C.: Circulating gonadotropins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease. Am. J. Obstet. Gynecol., 121: 496, 1975.
7. Goldzieher, J.W.: Polycystic ovarian disease. Fertil. and Steril., 35: 371, 1981.
8. Kasuga, Y.: Ovarian steroidogenesis in Japanese patients with polycystic ovary syndrome. Endocrinol. Japon, 27: 541, 1980.
9. McNatty, K.P.: Cyclic changes in antral fluid hormone concentrations in humans. Clin. in Endocrinol. and Metabol., 7: 577, 1987.
10. 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.
11. Rajaniemi, H.J., Ronberg, J., Kauppila, A., Ylöstalo, P. and Vikko, R.: Luteinizing hormone receptors in ovarian follicles of patients with polycystic ovarian disease. J. of Clin. Endocrinol. and Metabol., 51: 1054, 1980.
12. Stein, J.F. and Leventhal, M.L.: Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am. J. Obst. Gynec., 29: 181, 1935.
13. Yen, S.S.C.: The polycystic ovary syndrome. Clin. Endocrinol., 12: 177, 1980.
14. Yoshimura, Y., Nakamura, Y., Kamei, K., Oda, T., Higaki, K. and Iizuka, R.: Steroidogenesis of cultured granulosa cells from normal and polycystic ovaries. Endocrinol. Japon, 28: 697, 1981.

(特別掲載 No. 5447 昭59・1・26受付)