

359 培養子宮内膜間質細胞のMMP-1ならびにTIMP-1産生に対するプロゲステロンおよびEGFとIL-1 α の影響

広島大学

原 鐵晃, 岡本悦治, 林 聡, 児玉尚志,
大濱紘三

【目的】培養子宮内膜間質細胞をプロゲステロン(P4)で脱落膜化させ、P4およびEGFとIL-1 α が子宮内膜間質細胞のMatrix Metalloproteinase-1(MMP-1)とTissue Inhibitor of Metalloproteinase-1(TIMP-1)の産生にどのように影響しているのかを検討した。【方法】患者の同意の下に摘出子宮より正常子宮内膜(n=6)を採取し、酵素処理とメッシュ濾過により子宮内膜間質細胞を分離し培養した。コンフルエントを確認後、P4で刺激(濃度=0,30ng/ml)を開始し、刺激開始後8日目よりEGF(濃度=10,50,250ng/ml)かIL-1 α (濃度=5,50,500pg/ml)を添加し48時間培養した。P4刺激後は2日毎に培養上清を採取し、上清中のプロラクチン(PRL), MMP-1およびTIMP-1濃度をEIA法により測定した。【成績】PRLはP4刺激開始4日目以降は有意に上昇し(P<0.01), 培養細胞は脱落膜化していることが確認された。MMP-1の産生は刺激開始2日目以降は、P4刺激群では非刺激群の1/5~1/10へと有意に低下し、8日目にはP4刺激群では、非刺激群に比し1/5~1/20へと低下した(P<0.01)。逆に、TIMP-1産生はP4刺激開始4日目以降に僅かに上昇し、MMP-1/TIMP-1比は刺激開始後2日目以降に、有意に低下した(P<0.01)。また、EGFおよびIL-1 α 刺激により、MMP-1産生は基礎値の4~10倍に濃度依存的に上昇した。一方、TIMP-1産生はIL-1 α では変化がなかったが、EGFでは約2倍に増加した(P<0.05)。【結論】脱落膜は、P4の作用によりMMP-1/TIMP-1比が低く細胞外基質が破壊されにくい環境を形成しており、EGF刺激ではIL-1 α と比較して、TIMP-1の産生が増加することにより、MMP-1/TIMP-1比が低値となることが明らかとなった。

360 Acridine orange染色法によるsperm-egg fusionの判定

谷病院

片寄治男

【目的】Sperm-egg fusionの検出は、精子の受精能すなわちcapacitationおよび先体反応の評価に成り得る。Fusionの新しい検出法として、精子核クロマチンの性状によって異なる染色性を呈する核酸染色剤Acridine orange(AO)が有効か否か検討した。【方法】①卵の準備; 過排卵処理されたハムスターの卵管および卵巣から採取し、酵素処理により透明帯除去卵として用いた。②精子の準備; ハムスター精巣上体尾部より回収し、培養液中に静置することにより先体反応を惹起させた。③媒精; 精子濃度 3×10^6 /mlに調整された培養液300 μ l中に卵を移し、10分間培養した後、新鮮な培養液へ移し、さらに一定時間培養を継続した。④AO染色; カルノイ液中に卵を浸漬し2時間以上酸処理を施した。実体顕微鏡下に卵を滴下し、風乾後5分間染色を施した。AOはpH2.5に調整された緩衝液を溶媒に最終濃度0.02%で用い、観察には落射型蛍光顕微鏡を使用した。【成績】①成熟卵(metaphase II)を用いた場合; 媒精後30分より膨化精子核が観察されはじめ、膨化前にはAO染色でRed型を呈する精子核を認める時期が存在した。②未成熟卵(GV stage)を用いた場合; 媒精後60分では膨化精子核を認めず、全てAO染色でRed型の精子核に変化した。尚、精巣上体尾部精子核自体は全てAO染色がGreen型の蛍光を呈した。【結論】今回の成績は、AO染色が卵細胞質内で膨化現象を引き起こす以前の精子核の段階で、S-S結合の還元を受けた核を識別可能であることを証明した。本染色法がsperm-egg fusionの迅速かつ特異的な判定法になり得ることが示唆された。