

P-94 ビスフェノール A の卵巣顆粒膜細胞に対するアポトーシス誘導作用とその機序解明

東京大分院¹, 東京大²許 継平¹, 堤 治¹, 矢野 哲², 加藤賢郎¹, 藤原敏博², 高井 泰¹, 松見泰宇², 大須賀穰², 久具宏司², 武谷雄二²

【目的】内分泌攪乱物質ビスフェノール A (BPA) は最近動物実験で生殖機能への影響が示され、ヒト卵胞液中にも1nM程度の濃度で検出され、卵巣機能への作用が注目される。我々は顆粒膜細胞 (GC) への作用をアポトーシスの面から検討した。【方法】GC は、B6C3F1マウスの卵巣から採取し単層培養により実験に供した。(1) GC を、各濃度 (100fM-100μM) BPA で24-72時間培養し、MTT法でその生存率を測定した。(2) GC を100μMBPA で24-72時間培養後、BPA 不含培地で24時間培養し培養液中 estradiol (E2) 及び progesterone (P4) の濃度を ELISA 法で測定した。(3) GC を100μMBPA で24-72時間培養し、そのアポトーシスの有無を TUNEL 法及び Flow cytometry により検討した。(4) (3) と同様に培養した GC における Bax/Bcl2 の mRNA 及びタンパクレベルの発現量の変化は、定量的 RT-PCR 及び Western blot 法により検討した。【成績】(1) GC の生存率は100pMBPA で有意に抑制され、濃度及び時間依存性に低下し、100μM, 72時間後では、対照の45.7%に減少した。(2) 培養液中の E2濃度の変化は認められなかったが、P4濃度は時間依存性に有意に減少し、100μM, 72時間後では対照の22.8%に減少した。(3) 100μM を添加した GC において、アポトーシス誘導が TUNEL 法及び Flow cytometry で検出され、経時的にアポトーシス陽性率は上昇した。(4) 100μM BPA 添加の72時間後には、GC における Bax の mRNA 及びタンパクレベルの発現量は対照に比べ約1.5倍増加し、Bcl2の発現量は約25%抑制された。【結論】BPA は、環境中に存在する濃度で GC の生存に影響を与えることが示された。高濃度 (100μM) では GC にアポトーシスを誘導し、その作用に Bax/Bcl2 が関与していることが示唆された。

P-95 シスプラチン (CDDP) のラットにおける性成熟度の違いによる卵胞毒性発現に関する実験的検討—性発達期群と性成熟期群との比較—

久留米大

品川敦彦, 松尾 剛, 牛嶋公生, 杉山 徹, 西田 敬, 嘉村敏治

【目的】正常性腺に対する抗癌剤の毒性は、その発達過程により差があるとの報告がある。今回、シスプラチン (CDDP) の性成熟度の違いによる性腺への毒性の発現の違いを検討するため、性発達期と性成熟期のラットで CDDP 投与後の遺残卵胞数の変化から定量的検討を行った。【方法】雌の Wistar 系ラットの陰開口期前の3週齢のもの (15匹) と陰開口期を過ぎた6週齢のもの (45匹) を、それぞれ性発達期と性成熟期のモデルとした。CDDP は、実験的に求めた LD50値から投与量を設定し、投与期間を一性周期 (5日間) と二性周期 (10日間) として連日腹腔内投与を行った。最終投与後24時間で両側卵巣を摘出し、10%ホルマリン液にて固定後、4μm の連続切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色をした後、最大割面での遺残卵胞数を Pedersen and Peters の分類に準じて卵胞の成熟度別に計測した。なお、遺残卵胞数は両側卵巣の合計にて算出した。【成績】(1) 両群とも全卵胞数は投与量依存的な減少を示した。(2) 卵胞の成熟度により卵胞数の減少に差がみられた。特に成熟度の高い卵胞において有意な減少を認めた (p<0.05)。(3) 性発達期群は性成熟期群に比べて卵胞の遺残率が有意に高かった (P<0.05)。(4) 性発達期群においては、全卵胞中に占める小卵胞数の割合が性成熟期群より有意に高かった (P<0.05)。【結論】CDDP の投与により、ラットの正常卵胞数は投与量依存的な減少を示すが、小卵胞優位な環境下にある性発達期においては、卵胞数の減少は軽度であり、CDDP の卵胞毒性に対する耐性が高いことが示唆された。

P-96 透明帯 ZPA 合成ペプチドの同種免疫による抗体産生と避妊効果

兵庫・ダイコクドー・メディカル研究開発部¹, 兵庫医大先端研発生生殖², 兵庫医大³浜本昇一¹, 長谷川昭子², 伏 耀², 鴻上英晴¹, 香山浩二³

【目的】哺乳動物の卵の周囲をとりまく透明帯は、その強い抗原性と組織特異性から、避妊ワクチンへの応用が研究されている。天然のブタ透明帯のベッコおよび野生動物への応用はすでに試験的に実施され、一定の避妊効果が報告されている。本研究ではワクチンの材料として天然のものより計画的に大量生産できる合成ペプチドを抗原として用い、イヌの妊娠が阻止できるか否かを検討した。【方法】ZPA の No.50-67に対応する18アミノ酸からなるペプチドを化学合成し、キャリア蛋白としてジフテリアトキソイドをコンジュゲートした。5ヵ月令のビーグル犬 (♀) 3匹に蛋白量500μg を完全フロインドアジュバントとともに、皮内注射し、その後、発情の有無を観察しながら1ヵ月の間隔で4回の追加免疫を行った。血中抗体価の上昇は合成ペプチドに対する ELISA 法で判定した。最終免疫後、剖検して卵巣の組織学的検査を行った。【成績】対照の同月令の動物は実験期間少なくとも1回の発情を来したが、免疫に用いた動物は発情の兆候を全く示さなかった。血中抗体価は初回免疫後1ヵ月で著明に上昇し、その後実験終了まで高力価を維持した。卵巣の組織学検査では、原始卵胞は存在するものの、発育卵胞の著明な減少を認めた。【結論】透明帯タンパク ZPA の18アミノ酸からなる合成ペプチドによりイヌに不妊を誘導することに成功した。天然の抗原を用いた場合、同種抗原は免疫寛容のため抗体産生が起こらないとされてきたが、合成ペプチドを免疫原とした場合、同種の配列で高い避妊効果を得た。