



Title	Immunohistochemical Studies on the Localization of Aromatase and 17 α -Hydroxylase/C17-20Lyase (17 α -Lyase) in Estrous Cycling and Pregnant Hamster Ovaries
Author(s)	釣, 英明
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37973
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	釣英明
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第10151号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
医学研究科 生理系専攻	
学位論文名	Immunohistochemical Studies on the Localization of Aromatase and 17α -Hydroxylase/C17-20Lyase (17α -Lyase) in Estrous Cycling and Pregnant Hamster Ovaries (成熟ハムスターの性周期におけるアロマターゼおよび 17α 水酸化酵素/C 17-20リアーゼの局在に関する免疫組織化学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 藤田 尚男 (副査) 教授 橋本 一成 教授 岡本 光弘

論文内容の要旨

(目的)

卵巣においてコレステロールから数段階の反応を経てエストロゲンが生合成される。これらの反応は性周期に伴って周期的に、また妊娠によって変化する。エストロゲン合成の最終ステップのテストステロンからエストラジオールへの反応を触媒する酵素がアロマターゼであり、 17α 水酸化酵素/C 17-20リアーゼはそれより前の段階であるプロゲステロンからアンドロステンジオンへの反応を触媒する。この研究は我々が行っているストロイドホルモン合成のメカニズムの研究の一環であり、卵巣における両酵素の性周期および妊娠時における変化を免疫組織化学的に観察し、超微構造との関係を調べたものである。

(方法)

4日性周期の成熟雌ハムスターを用いた。性周期は膣粘膜のスメアを観察することにより確認した。免疫組織化学的研究には4% paraformaldehydeを用いて灌流固定後に凍結切片を作成した。第1抗体にはウサギ抗アロマターゼ抗体(1:500)及びウサギ抗 17α 水酸化酵素/C 17-20リアーゼ(1:1000)、第2抗体にはFITC標識抗ウサギIg G抗体を用いて、蛍光顕微鏡にて観察した。

超微構造の検索には2.5% glutaraldehydeで灌流固定し、細切の後1%オスムウム酸による後固定、酢酸ウラニルによるブロック染色を行い、脱水・包埋後、超薄切片を作成、二重染色の後、電子顕微鏡で観察した。

(成績)

4日性周期の成熟ハムスターでは排卵は発情前期と発情期の間の深夜に起こる。この排卵に続く日を

第1日（発情期）とし、以後第2日（発情間期）、第3日（発情間期）、第4日（発情前期）とする。

第2日（発情間期の1日目）

間質腺、黄体、多数の一次卵胞、濾胞腔を持つ二次卵胞が見られる。黄体の果粒層ルテイン細胞、二次卵胞の果粒層細胞にアロマターゼ陽性反応が観察された。 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼの反応は二次卵胞の内卵膜細胞に陽性であった。

第3日（発情間期の2日目）

5～6個のグラーフ卵胞が出現する。アロマターゼは二次卵胞及びグラーフ卵胞の果粒層細胞に、 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼは二次卵胞の内卵胞膜において陽性を示した。

第4日（発情前期）

10時では第3日とほぼ同様であった。その夕方（17時）には大きなグラーフ卵胞のみ強いアロマターゼ陽性の反応が見られたが、その他の二次卵胞では陽性反応が見られなかった。 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼはグラーフ卵胞の内卵胞膜にのみ強い陽性反応を示した。その夜（21時）にはグラーフ卵胞の果粒層細胞にアロマターゼの強い陽性反応が見られたが、 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼは陰性となつた。

第1日（発情期）

卵巢にはグラーフ卵胞は無く、新しく形成された黄体が見られた。アロマターゼの陽性反応はその果粒層ルテイン細胞にのみ見られた。これ以外の一次卵胞、間質腺細胞はまったく陰性であった。 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼに陽性を示す細胞はまったく観察されなかった。

性周期のいずれの時期においてもアロマターゼは卵胞の果粒層細胞と黄体の果粒層ルテイン細胞に陽性を示した。又 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼは性周期の第2日から第4日の夕方（17時）までの二次卵胞の内卵胞膜細胞において陽性であった。

妊娠ハムスターでは妊娠黄体、様々な発育段階の卵胞、そして間質腺が見られる。

アロマターゼの反応は二次卵胞の果粒層細胞および、妊娠黄体の果粒層ルテイン細胞に陽性であった。 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼは二次卵胞の内卵胞膜細胞にのみ強い陽性を示した。

超微構造

第2日（発情間期の1日目）

二次卵胞の果粒層細胞（アロマターゼ陽性）で、脂肪滴、層板状のクリステを持ったミトコンドリア、粗面小胞体（r ER）、free ribosome などが観察された。

また二次卵胞の内卵胞膜細胞（ 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼ陽性）では2種類の細胞が見られた。一方は線維芽細胞様の細胞（r ER が発達）で多数存在し、それらの中にステロイド産生細胞の特徴を示す細胞（滑面小胞体（s ER）が発達し、多数の脂肪滴、円形または卵円形でクリステが管状のミトコンドリアを持つ）が少數認められた。

第4日（発情前期）の17時

グラーフ卵胞の果粒層細胞（アロマターゼ陽性）では多数の脂肪滴、円形または卵円形で管状のクリステを持ったミトコンドリア、発達した r ER の他、s ER が新生されていると思われる像が観察された。

また内卵胞膜細胞 (17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼ陽性) ではステロイド産生細胞の特徴を持つ内卵胞膜細胞が多数観察された。この時期の二次卵胞 (アロマターゼ陰性, 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼ陰性) の超微構造は第2日のものと同じであった。

(総括)

- 1) アロマターゼは発情間期の初期では二次卵胞に、そしてその後発育してくるグラーフ卵胞と二次卵胞の両方で果粒層細胞に陽性反応を示すが、排卵に近い時期ではグラーフ卵胞のみ陽性となり、排卵後には新しく形成された黄体で果粒層細胞に由来する果粒層ルテイン細胞に陽性を示す。このことはアロマターゼが次に排卵を起こす卵胞で選択的につくられていることを示すと思われる。ハムスターの卵巢では、一回の性周期においてグラーフ卵胞まで成長し、排卵に至る卵胞の数は限られている事が知られている。アロマターゼがその限られた数の卵胞でのみ陽性であることは、排卵する卵胞の数を調節する機構において何らかの役割を果たしている事を示唆していると思われる。
- 2) 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼは発情間期から発情前期の途中 (第4日の17時) までは内卵胞膜細胞に陽性を示すが、さらに排卵に近い時期 (21時) には陰性である。つまり、アロマターゼが排卵の前後を通じて存在するのに対し、 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼは排卵の前には消失する。 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼの関与する反応はアロマターゼより前の段階であり、その消失によってアロマターゼの存在に関わらず、エストロゲンは合成されなくなる。
以上のことからハムスターにおけるエストロゲン合成の急激な減少は、内卵胞膜細胞で 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼの消失によるテストステロン生産の停止に起因すると考えられる。
- 3) 果粒層細胞の超微構造は典型的なステロイド産生細胞の特徴は少なく、r ER が発達し、ミトコンドリアの形状も異なる。これはステロイド産生の他にペプチド (蛋白質) 合成も行うことを示していると考えられる。
- 4) 妊娠時には、妊娠黄体にアロマターゼ、二次卵胞にアロマターゼと 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼの陽性反応がある。ラット及びモルモットなど他の齧歯類では妊娠時には両酵素のうち片方は陰性であり、したがってエストロゲンの合成は行われていないと考えられるが、今回の研究ではハムスターでは妊娠期でもアロマターゼ、 17α 水酸化酵素/C 17-20 リアーゼ共に卵巢に存在する事を示しており、この動物の妊娠卵巢はエストロゲンを de novo に合成する能力を持つものと思われる。

論文審査の結果の要旨

ハムスターの卵巢において、アロマターゼは二次卵胞とグラーフ卵胞の果粒層細胞、および黄体の果粒層ルテイン細胞に陽性を示す。 17α リアーゼは発情間期から発情前期の途中まで二次卵胞およびグラーフ卵胞の内卵胞膜細胞に陽性反応を示すが、排卵に近い時期に陰性となる。

以上から排卵に伴いエストロゲン合成能力が消失するのは、 17α リアーゼの消失により男性ホルモンの合成が停止することが原因であることが形態学的に示された。

両酵素が陽性の場合、果粒層細胞には rER が発達し、また内卵胞膜細胞は典型的なステロイド産生細胞の超微構造を示すが、 17α リアーゼの欠失する時期にはこの特色は弱くなる。

妊娠時には、妊娠黄体にアロマターゼ、二次卵胞にアロマターゼと 17α リアーゼの陽性反応があった。これにより、この動物では妊娠卵巣がエストロゲンを de novo に合成する能力を持つ可能性が示された。

以上の研究は博士（医学）の学位を与える価値を充分有するものである。