

学 位 論 文 題 名

排卵期ラット卵巢における一酸化炭素 (NO) の作用：
排卵数，ステロイド産生，ならびに
卵巢血流への影響について

学位論文内容の要旨

はじめに

生体内で産生される一酸化窒素 (NO) は、排卵機構においてさまざまな役割を担っている。卵巢には血管内皮型 NO 合成酵素 (endothelial NO synthase: eNOS) と誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase: iNOS) が存在しており、卵巢局所での NO 産生が、排卵期卵巢の機能にとって重要であることが示唆されている。しかし、これら2つのアイソフォームのそれぞれと、排卵機構との関連については未だ明らかにされていない。また、NOが卵巢の血流調節を通じて生理的機能を発揮している可能性が推測されるが、NOがどのように卵巢血流 (ovarian blood flow: OBF) の制御に関与しているかについての詳細な検討はこれまでになされていなかった。本研究は、(1) ラット卵巢灌流系を用いて、卵巢に発現している eNOS と iNOS それぞれが排卵数ならびに卵巢ステロイド産生に及ぼす影響を評価し、(2) ラットの排卵期 OBF の維持・調節において NO が果たす役割を *in vivo* で検討することを目的とした。

対象と方法

(1) ラット卵巢灌流において NOS 阻害剤が排卵数と卵巢ステロイド産生に及ぼす影響

28日齢の雌 Sprague-Dawley (S-D) ラットに PMSG (20 IU) を皮下投与して、48時間後に右卵巢を摘出し、灌流装置に接合した。卵巢灌流は、LH (0.2 $\mu\text{g/ml}$) または LH + IBMX (それぞれ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ と 200 μM) を灌流メディウムに加えた時点から20時間継続され、LH/LH + IBMX 付加の30分前に、非選択的 NOS 阻害剤 N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA; 300 μM) または特異的 iNOS 阻害剤 aminoguanidine bicarbonate (AG; 300 μM または 1 mM) のいずれかを灌流装置に付加した。灌流メディウム内のエストラジオール (E2)、プロゲステロン (P4) ならびに NO の代謝産物である亜硝酸イオン (NO_2^-) と硝酸イオン (NO_3^-) 濃度を測定し、また、灌流終了時に排卵数を算定した。

(2) NOS 阻害剤の排卵期卵巢血流 (OBF) に及ぼす影響

26日齢の S-D ラットに PMSG (15 IU) を皮下投与した。一部のラットには PMSG 投与の48時間後に hCG (15 IU) を腹腔内注射した。排卵前卵胞が発育する PMSG 投与 46~48時間後

(PreOvulatory; PO 群)、または OBF が最も増加する hCG 投与 6~8時間後 (OVulatory; OV 群) から OBF 測定をおこなった。麻酔下ラットの片側卵巢にレーザードップラー・プローブを固定して、OBF を連続的に記録し、同時に腸骨動脈留置カテーテルより平均動脈圧を計測した。排卵期の OBF 調節における NO の役割を検討するため、以下のように NOS 阻害剤を全身的または卵巢局所に投与して、OBF の変動を計測した。

- ①非選択的 NOS 阻害剤 N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 4 mg/kg または 10 mg/kg) を経静脈的に OV 群に投与して、全身的に NOS を抑制した。
- ②PO 群と OV 群の卵巢プルザに直径 0.4 mm の PTFE チューブを留置し、L-NAME (1 mg/kg)

をブルザ内に注入することで NOS を卵巣局所的に阻害した。

研究成績

LH/LH+IBMX 刺激によって灌流卵巣の NO 産生は増加したが、L-NMMA と AG はともに NO の生成を有意 ($p<0.05$) に抑制した。LH+IBMX の添加により、中央値 12.0 個 (range 6-17; $n=10$) の排卵が観察されたが、非選択的 NOS 阻害剤 L-NMMA は排卵数を有意 ($p<0.05$) に抑制した (中央値 4.0, range 1-14; $n=5$, 以下同じ順序で表示)。一方、選択的 iNOS 阻害剤 AG は 300 μM と 1 mM のいずれの濃度においても効果を示さなかった (11.5, 6-18; $n=6$ および 11.0, 7-15; $n=5$)。いずれの NOS 阻害剤も卵巣のステロイド産生に有意な影響を及ぼさなかった。LH 単独によって刺激された灌流卵巣でも LH+IBMX を添加した場合と同様に、L-NMMA 投与群のみが排卵数の有意 ($p<0.05$) な低下を示した (LH 群 7.5, 3-12; $n=4$, AG 群 7.0, 1-15; $n=5$, L-NMMA 群 0.0, 0-8; $n=5$)。

OV 群のラットに L-NAME を経静脈的に投与すると、平均動脈圧は有意 ($p<0.01$) に上昇し、また、OBF は静注 5 分後に投与前値に対し、4 mg/kg 群で $70.1\pm 4.9\%$ ($n=7$)、10 mg/kg 群で $63.3\pm 2.4\%$ ($n=4$) と、低下 ($p<0.01$) を認めた。しかし、その後 OBF は再上昇に転じ、30 分後にはすべてのラットにおいて L-NAME 投与前のレベルにまで復帰した。L-NAME の卵巣ブルザ内注入は、OV 群と PO 群のいずれにおいても平均動脈圧を変動させなかった。OBF は L-NAME 投与によって有意 ($p<0.01$) に減少し、5 分後において L-NAME 投与前値に対し、OV 群では $63.6\pm 13.0\%$ ($n=9$)、PO 群では $60.0\pm 5.6\%$ ($n=5$) であった。この OBF の低下は L-NAME 投与 30 分後の OBF 計測終了時まで持続し、基礎値に対し $68.6\pm 4.3\%$ (OV 群) と $72.8\pm 4.8\%$ (PO 群) であった。

考察

ラット卵巣灌流系において、L-NMMA により eNOS と iNOS 両方の活性を阻害すると排卵数は減少し、対照的に iNOS 特異的阻害剤 AG は排卵数に影響を及ぼさなかった。この結果より、ラットの排卵機構において、iNOS は不可欠な要素ではないことが示された。一方、灌流卵巣による NO 産生量は、L-NMMA 群と AG 群のいずれにおいても同等に抑制されており、これは排卵期卵巣で産生される NO の大部分が iNOS 由来のものであることを示すとともに、卵巣内の eNOS 活性が保たれている限り、NO 産生が低いレベルであっても排卵機構は十分に維持され得ることを示すものと考えられた。

卵巣での NOS 活性を選択的に阻害したときに OBF が低下したことから、排卵期卵巣の血流維持のためには卵巣局所での NO 産生が重要であることが示された。対照的に、L-NAME の全身投与は一過性の OBF 低下しか引き起こさず、全身的な NOS 阻害に対しては OBF を維持するような代償機構が存在する可能性が考えられた。NO は OBF の維持・調節を通じて排卵機構と関連しているものと推測されるが、OBF の持続した減少を認めない NOS 阻害剤の全身性投与によっても排卵数の減少が生じることから、NO の血流調節以外の機能も排卵プロセスにおいては重要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征 一 郎

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学位論文題名

排卵期ラット卵巢における一酸化炭素 (NO) の作用：

排卵数，ステロイド産生，ならびに

卵巢血流への影響について

本研究は、ラット卵巢灌流系を用いて、卵巢に発現している eNOS と iNOS それぞれが排卵数ならびに卵巢ステロイド産生に及ぼす影響を評価し、ラットの排卵期卵巢血流 (OBF) の維持・調節において NO が果たす役割を in vivo で検討することを目的とした。

28 日齢の雌 Sprague-Dawley (S-D) ラットに PMSG (20 IU) を皮下投与して、48 時間後に右卵巢を摘出し、灌流装置に接合し、LH/LH + IBMX 付加の 30 分前に、非選択的 NOS 阻害剤 N^{G} -monomethyl-L-arginine (L-NMMA; 300 μM) または特異的 iNOS 阻害剤 aminoguanidine bicarbonate (AG; 300 μM または 1 mM) のいずれかを灌流装置に付加した。灌流メディウム内のエストラジオール (E2)、プロゲステロン (P4) ならびに NO の代謝産物である亜硝酸イオン (NO_2^-) と硝酸イオン (NO_3^-) 濃度を測定し、灌流終了時に排卵数を算定した。

26 日齢の S-D ラットの排卵前卵胞が発育する PMSG (15 IU) 投与 46~48 時間後 (PreOvulatory; PO 群)、または OBF が最も増加する hCG (15 IU) 投与 6~8 時間後 (OVulatory; OV 群) から、麻酔下ラットの片側卵巢にレーザードップラー・プローブを固定して OBF を連続的に記録し、同時に腸骨動脈留置カテーテルより平均動脈圧を計測した。排卵期の OBF 調節における NO の役割を検討するため、NOS 阻害剤を全身的または卵巢局所に投与して、OBF の変動を計測した。即ち、非選択的 NOS 阻害剤 N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 4 mg/kg または 10 mg/kg) を経静脈的に OV 群に投与して、全身的に NOS を抑制した。PO 群と OV 群の卵巢ブルザに直径 0.4 mm の PTFE チューブを留置し、L-NAME (1 mg/kg) をブルザ内に注入することで NOS を局所的に阻害した。

ラット卵巢灌流系において、L-NMMA により eNOS と iNOS 両方の活性を阻害すると排卵数は減少し、対照的に iNOS 特異的阻害剤 AG は排卵数に影響を及ぼさなかった。この結果より、ラットの排卵機構において、iNOS は不可欠な要素ではないことが示された。一方、灌流卵巢による NO 産生量は、L-NMMA 群と AG 群のいずれにおいても同等に抑制されており、これは排卵期卵巢で産生される NO の大部分が iNOS 由来のものであるこ

とを示すとともに、卵巣内の eNOS 活性が保たれている限り、NO 産生が低いレベルであっても排卵機構は十分に維持され得ることを示すものと考えられた。

卵巣での NOS 活性を選択的に阻害したときに OBF が低下したことから、排卵期卵巣の血流維持のためには卵巣局所での NO 産生が重要であることが示された。対照的に、L-NAME の全身投与は一過性の OBF 低下しか引き起こさず、全身的な NOS 阻害に対しては OBF を維持するような代償機構が存在する可能性が考えられた。NO は OBF の維持・調節を通じて排卵機構と関連しているものと推測されるが、OBF の持続した減少を認めない NOS 阻害剤の全身性投与によっても排卵数の減少が生じることから、NO の血流調節以外の機能も排卵プロセスにおいては重要であることが示唆された。

公開発表に際して、副査の石橋教授から、NOS 阻害剤の抑制効果に対する確認について、NMR での観察につて、ヒトにおける NOS 阻害剤の排卵抑制効果について、NOS 阻害剤の卵巣以外の生体機能に対する影響などについて質問があった。また、副査の本間教授からは、阻害剤によって eNOS が実際に阻害されている程度について、eNOS による血流量減少の影響を介さない作用が排卵数の低下に働いているのかについて、iNOS の卵巣における生理的役割について、などの質問があった。最後に主査の藤本教授からは、非選択的 NOS 阻害剤を灌流系と in vivo 系とで使い分けた理由について、NOS 阻害剤による排卵数の低下の程度と卵巣ステロイドの変動との間に生体内では考えられない乖離が灌流系である理由について、などの質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、実験成績の解析結果、最新の文献情報、自身の研究経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果と申請者の研鑽を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。