

学位論文題名

マウスの妊娠成立機構における免疫学的研究

—特に血小板活性化因子とマクロファージ遊走阻止因子について—

学位論文内容の要旨

血小板減少症は、妊娠に対する母体の最初の反応とされている。本研究では、強力な生物活性を有する脂質である血小板活性化因子(platelet activating factor; PAF)を、母体末梢血中の血小板数の減少を誘起する有力物質として検討した。まず、マウス胚がPAFを産生する能力について研究した。即ち、C57BL/6系マウスの2細胞期胚を20個あるいは30個ずつをwhitten培養液で24時間培養した。これらの培養液は採取され、脂質の抽出に供された。続いて、これらの抽出物を薄層クロマトグラフィーに展開し、PAFを抽出した。抽出された胚由来PAFは、ウサギ全血中における血小板凝集によって定量され、さらにPAFレセプターアンタゴニストであるSRI63-441を用いて確認された。これらの結果は、胚培養液からの抽出物中に、SRI63-441によって血小板凝集活性が抑制される約10ng/mlのPAFが存在していることを示していた。次に、マウス血小板のPAFに対する反応性を調べた。マウス全血中に浮遊している血小板に83 μ g/mlのPAFを添加しても、マウス血小板の凝集および減少は誘起されなかった。これらの結果から、胚から放出されたPAFは、直接的に母体の血小板に作用することなく、他の生物活性を持つ物質を介して母体に作用することが示唆された。

PAF以外にも、多彩なサイトカインが妊娠の初期に重要な役割を

担っていると考えられる。本研究では、マクロファージを活性化するサイトカインのひとつであるマクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) について、マウスの妊娠との関連性について検討した。まず、雌性生殖器および初期胚におけるMIFのmRNAの発現を調べた。即ち、ノーザンブロットング分析によって、MIF mRNAが、着床前期および発情周期のいずれの時期にも、卵巣、卵管および子宮に発現していることが確認され、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 分析では、MIF mRNAの発現が、排卵直後の未受精卵子、受精した1細胞期胚、2細胞期胚、8細胞期胚および胚盤胞に認められることを明らかにした。次に、妊娠したマウスの血中および羊水中MIF濃度をELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって測定した。マウス母体血中MIF濃度は10-200 ng/mlであり、MIFの濃度は妊娠3日目に最低となった。妊娠4日目には、MIFの濃度は非妊娠の濃度に戻り、着床後も変化は認められなかった。MIFは羊水中からも検出されたが、その濃度は母体末梢血中濃度と相関を示さなかった。さらに、MIFの初期胚に対する影響を検討し、MIFは胚の発育を抑制する作用をもっていないことが示された。MIFの妊娠母体および胚発生に対する詳細な生理学的機能は、依然、不明なままであるが、本研究は、MIFが妊娠の成立において重要な役割を担っていることを示唆している。

以上の結果から、哺乳動物の妊娠にPAFやMIFが関与していることが示唆され、妊娠成立機構の解明に有効な物質であることが推測された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	金川弘司
副査	教授	斉藤昌之
副査	教授	渡邊智正
副査	講師	西平順

学位論文題名

マウスの妊娠成立機構における免疫学的研究

—特に血小板活性化因子とマクロファージ遊走阻止因子について—

妊娠成立機構に関する免疫学的研究は、現在までのところ、あまり多く報告されていない。本研究では、特に、知見の乏しい血小板活性化因子 (platelet activating factor; PAF) とマクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) について検討した。

血小板減少症は、妊娠に対する母体の最初の反応とされている。本研究では、この現象を誘起する有力物質としてPAFを検討した。まず、胚のPAF産生能力を調べるために、20-30個のC57BL/6系マウスの2細胞期胚を24時間培養した。これらの培養液からPAFを抽出した後にin vitro bioassay法によって約10 ng/mlのPAFを定量し、同様にPAFレセプターアンタゴニストを用いてPAFの存在を確認した。次に、マウス血小板のPAFに対する反応性を調べた結果、83 μ g/ml PAFに対しても、マウス全血中に浮遊する血小板の凝集や減少は認められなかった。これらの結果から、胚から放出されたPAFは、直接、母体血小板には作用せず、母体に作用する他の生物活性を持つ物質の探求が望まれた。

以上の結果から、PAF以外にもサイトカインが妊娠の成立に重要な役割を担っていると考えられるので、マクロファージを活性化するサイトカインであるMIFについて検討した。MIF mRNAの発現は、初めて卵巣、卵管および子宮ではノーザンブロッティング法により確認され、着床前の初期胚にもReverse transcription-polymerase chain reaction法で確認された。さらに酵素免疫抗体法では、初めて血中MIF値が妊娠3日目に最低となること、羊水中からもMIFが検出されることが認められた。これらの結果から、MIFは妊娠に関与する物質であることが示唆された。

以上のとおり、本研究により哺乳動物の妊娠にPAFやMIFが関与していることが示唆された。これらは、PAFやMIFに関する基礎的データであるとともに、哺乳動物の妊娠成立機構の免疫学的解明に寄与するものと考えら

れた。よって、審査員一同は、鈴木寛人氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。