

病理組織学的検査におけるマウス卵巢の原始卵胞評価法

千坂亜希子, 白見憲司, 熊谷文明, 野口 聡, 丸茂秀樹, 斉藤義明, 桑形麻樹子

Methods for quantifying ovarian primordial follicles in mice

Akiko CHISAKA, Kenji USUMI, Fumiaki KUMAGAI, Satoshi NOGUCHI

Hideki MARUMO, Yoshiaki SAITO, Makiko KUWAGATA

緒言

前臨床試験における卵巢毒性の検出は、曝露された化学物質が雌の繁殖能に対する影響を及ぼすか否かを評価するために重要である。原始卵胞や一次卵胞が受ける障害は不可逆的であり、その後の卵胞の発育に悪影響を及ぼす。卵巢の形態は性周期に伴い変化し、絶えず成長および退行する卵胞と黄体が同一組織に存在する。したがって、その形態学的評価は卵巢自体の形態評価のみならず、性周期の変化、視床下部あるいは内分泌機能への影響も考慮して行う必要がある。医薬品ICH-M3ガイドラインの改正に伴い、反復投与毒性試験において病理組織学的に卵巢毒性の有無を評価し、雌の繁殖能力への影響も予測しなければならない¹⁾。また、繁殖試験においては原始卵胞を数えて、胎生期に曝露された化学物質による次世代の卵巢への影響を評価することが推奨されている²⁾。このように、病理組織標本作製から鏡検まで毒性病理担当者にとって卵巢毒性の評価に課せられた責任は大きい。今回、われわれは卵巢の組織標本作製法の基礎的な手技を確認するとともに、原始卵胞数の評価法を検討した。

材料および方法

11週齢の雌ICRマウス(Crj:CD-1(ICR))を用いた。数日前から腔垢標本作製して性周期を観察し、休止期2日目の動物を順次解剖した。卵巢は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液にて浸漬固定し、長軸に沿って卵巢を2分割に切り

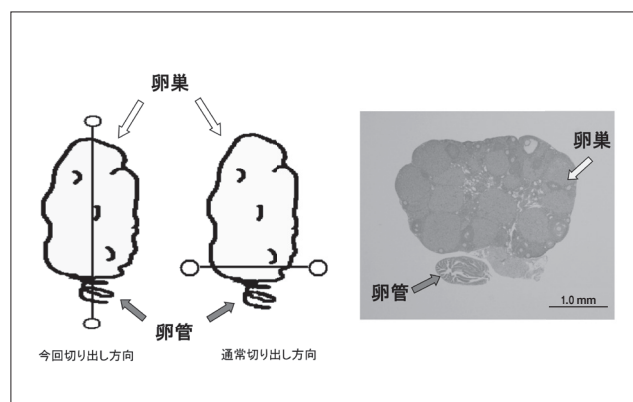


図1 マウス卵巢の切り出し方法

通常は卵巢門部を長軸と平行に切り出すが、今回は長軸にそって2分割して切り出した。

出した(縦断面方向)。常法に従ってパラフィン包埋し、薄切用ブロックを作製した。次に回転式マイクロームを用いて厚さ約4 μ mの連続薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を行った。原始卵胞数の観察は光学顕微鏡を用いて4人で分担して実施した。なお、あらかじめ複数の観察による鏡検を実施して計数結果に観察者による差がないことを確認している。

結果および考察

1. 切り出しの必要性の検討

通常の業務においては、卵巢の病理組織学検査では連続薄切切片は作製しない。また、標本作製のために卵巢門部で卵巢側の組織を一部切り出した後、薄切する。しかし、今回は卵巢1つあたりの原始卵胞数を評価するために、卵巢を卵巢門を含む面で2分割し連続薄切切片を作製した(図1)。卵巢を2分割とすることにより薄切切片

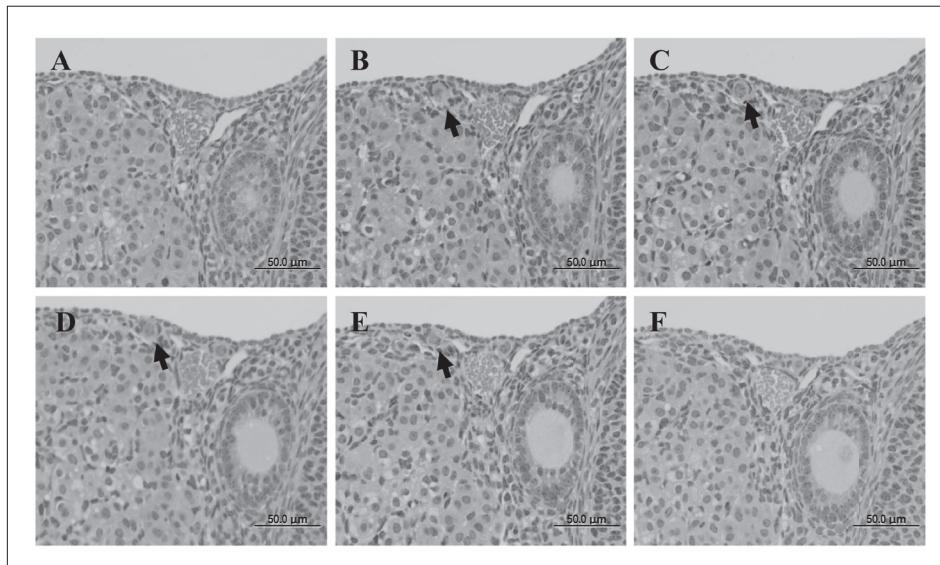


図2 マウス卵巣の連続薄切切片組織像（4 μm 切片，HE 染色）
 原始卵胞（矢印）は，BからEの切片に観察される。

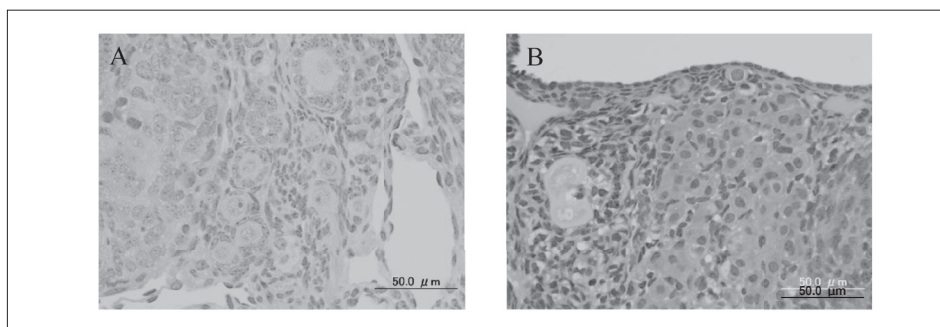


図3 マウス卵巣の原始卵胞（HE 染色）
 原始卵胞は卵巣門付近（A）および卵巣表面（B）に観察される。

表1 ICR マウスにおける原始卵胞数および組織標本作製

動物	卵巣 a)	原始卵胞数 b)	平均原始卵胞数 (1個)	切片枚数	スライド枚数 c)
A	右	404	380 ± 33.9	360	30
	左	356		384	32
B	右	616	599 ± 24.7	264	22
	左	581		144	12
C	右	449	375 ± 104.7	228	48
	左	301		312	26
D	右	407	356 ± 72.8	144	12
	左	304		300	25
E	右	542	542	324	27
	左	他検査に用いた		—	—
F	右	407	378 ± 41.0	432	36
	左	349		252	21
G	右	266	283 ± 24.0	348	29
	左	300		360	30

a) 左右両側を観察した。

b) 厚さ約4μmで連続的に薄切した切片を5枚(20μm) おきに観察して，原始卵胞数を数えた。

c) 1枚のスライドに10～12枚の薄切標本を載せた。

枚数は少なくなったが、マウスの卵巣を等分に2分割する切り出し作業、包埋操作、標本観察時の煩雑さ等から総合的に考察すると、マウス卵巣の連続的な薄切切片を作製する場合、切り出しをせずに包埋するほうが良いと考えられた。

2. 原始卵胞の大きさの確認

1つの原始卵胞の大きさを確認するために、顕微鏡下で同一の原始卵胞を連続的に観察した結果、いずれの原始卵胞も常に連続薄切切片の3～4枚（約12～16 μm ）にわたって観察されていた（図2）。この結果から、評価の際には連続的に薄切された切片を5枚おき（約20 μm おき）に観察し、その切片の原始卵胞を数えることで、重複して数えることはなく、また全体の原始卵胞数の中で観察し得る原始卵胞数も一定になると考えられた。

3. 原始卵胞の数および評価

原始卵胞は卵巣門付近および卵巣表面に存在している（図3）。約20 μm おきの薄切切片を選択して連続切片を観察し、卵巣一個あたりの原始卵胞数を数えた（表1）。その結果、原始卵胞数は動物による個体差はあったが、観察者間に顕著な差はなかった。ICRマウスでは1つの原始卵胞の直径は約12～16 μm であったために、20 μm

おきに薄切することで重複して原始卵胞を数えることはないと考えられた。しかし、1個の卵巣を20 μm おきに薄切すると薄切枚数は70～80枚と多数になり、その全てを観察することは、各群の動物数が20匹以上となる繁殖試験では現実的ではない。

今回の検討結果から、約100 μm おきの亜連続薄切切片標本を作製すると1個の卵巣における薄切枚数は20枚以下になり、繁殖試験等の実務における標本作製作業および原始卵胞を数える際に適切な薄切枚数ではないかと考えられた。なお、観察を約100 μm おきとした場合には、得られた結果の5～6倍が1つの卵巣における総原始卵胞数の概算となることを念頭において結果の解釈をする必要がある。

文献

- 1) 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」、薬食審査発0219第4号、平成22年2月19日
- 2) Regan KS, Cline JM, Creasy D, et al.: STP Position paper: Ovarian follicular counting in the assessment of rodent reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* 2005; **33**: 409-412