密度勾配法によるラット卵巢の 黄体ホルモン分泌細胞の分離

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

内分泌異常部門

熊井昭彦, 曹春吉, 坂本忍, 田井宜人,
左雨秀治, 藤沢博, 岡本良平

Preparation of Progesterone Secreting Cells
from Rat Ovaries by a Density Gradient

**Akihiko KUMAI, Haruyoshi SOH, Shinobu SAKAMOTO,
Yoshihito TAI, Shuji SASSA,
Hiroshi FUJISAWA and Ryohei OKAMOTO**

Department of Endocrinology, Medical Research Institute

Tokyo Medical and Dental University

Tokyo, Japan

Isolation of progesterone secreting cells from the ovaries of immature rats pretreated with pregnant mare serum gonadotropin (PMS) was conducted by a simple procedure which combined the collagenase digestion with a density gradient method. After digestion of the ovarian tissue slices by the enzyme, the residue was gently pressed and placed on a sucrose density gradient. Three bands appearing in the tube after centrifugation were designated as S-1, S-2 and S-3 from the top to the bottom, respectively. The S-1 cells from the ovaries at 6 days after PMS secreted the greatest amount progesterone, i.e. approximately 430ng per 10^5 cells during the 18th incubation. Progesterone secretion from the S-2 cells was less than 48% of that from the S-1 cells. A physiological interrelation between the S-1 and S-2 cells remains unexplained by the present experiment. The luteal cells were yellow, spheroidal and 15 to 40μ in diameter. Many vesicle-like particles were found on the cell surfaces. Progesterone secretion from the prepared cells was stimulated significantly by hCG in vitro. This result indicates that progesterone secreting cells isolated by the collagenase-sucrose density gradient preserve their native function as luteal cells.

The procedure for preparation of luteal cells in the present report may provide a suitable model for in vitro studies on the corpus luteum.

緒 言

卵巢黄体の steroidogenesis は種々の蛋白質ホルモンの支配下にあるが、これら蛋白質ホルモンの

影響はその作用時期, 量および各種ホルモンの相互作用などとも関連して複雑であるため容易には理解し難い。黄体の機能におよぼす蛋白質ホルモンの影響を定量的に研究するためには先ず卵巢の組織から黄体ホルモン分泌細胞を分離することが必要である。近年, Strauss¹³⁾ および Conti⁴⁾ は collagenase 消化によってラット卵巢から黄体細胞を分離している。黄体細胞の分離には一般に collagenase 処理が用いられているが, 黄体化したラットの卵巢組織は高濃度の酵素で消化しても分離される細胞の収量は比較的少なく, 大部分の黄体細胞は組織中に残存している。今回, 我々は酵素処理した組織を機械的に押し潰したのち, 蔗糖密度勾配遠心法を用いて黄体ホルモン分泌細胞を選択的に収率よく集めることを得た。このようにして単離した黄体細胞の浮遊液を使用することにより, 下垂体蛋白質ホルモンが黄体細胞の steroidogenesis におよぼす影響を定量的に観察することができると考えられる。

実験材料および方法

1. 実験動物

Sprague-Dawley 系のメスラットを用い, 人工照明 (午前 6 時—午後 9 時) 下に固形飼料および水を自由に摂取させた。22 日令で 25IU の PMS (セロトロピン, 帝国臓器製薬) を皮下注射して使用した。

2. 試薬

卵巢組織を消化するため collagenase (134U/mg: Millipore Corporation), trypsin (1:250; Difco Laboratories) および DNase (3,000U/mg, Miles Laboratories) を用いた。すなわち, Calcium-magnesium free balanced salt solution (CMF) で 0.2% trypsin 溶液を作成し, これに collagenase を 0.2% となるように, また, DNase を 50 μ g/ml の割合で溶解した。Eagle's MEM (ニッスイ製薬), 仔牛血清 (FCS) (加熱不活性化; Gibco Laboratories), Hepes (N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid; Sigma Chemical) により 10% FCS, 20mM Hepes, Streptomycin (100 μ g/ml, 明治製薬), penicillin G Kalium (100U/ml, 明治製薬), および Fungizone (250 μ g/ml, Gibco Laboratories) を含む Eagle's MEM 溶液を作成し, 10% Sodium bicarbonate 溶液で pH 7.4 に調製した。蔗糖 (平衡密度勾配遠心用, 和光純薬), 1,2-³H-progesterone (55.0Ci/mmol, NEN), 20 α -1,2-³H-hydroxypregn-4-ene-3-one (55.7Ci/mmol, NEN), 抗 progesterone 11 α -BSA 血清および抗 20 α -dihydroprogesterone-3-thyroglobulin 血清 (Miles Laboratories), progesterone (Merck) を使用した。なお, 20 α -dihydroprogesterone は帝国臓器製薬森弘博士により提供された標品を用いた。

3. 黄体ホルモン分泌細胞の分離法

PMS 注射 4~8 日目のラットより卵巢を採取し, 被膜, 卵管および脂肪組織を取り除いてから, 実体顕微鏡下で結合組織や卵胞を除去したのちハサミで細切した。これを CMF 溶液で数回洗浄後, 0.2% collagenase-0.2% trypsin および DNase (50 μ g/ml) を加え, 37 $^{\circ}$ C, 45 分間振盪を行った (Model G76 振盪培養器, NBS 製)。酵素消化後, 組織を Hanks 液で数回洗浄して細かい結合組織片などの浮遊物を除去した。消化された組織を Teflon homogenizer 中に入れ, 組織の形状が消失するまで可能な限り軽く押し潰した。Hanks 液を加え駒込ビペットで数回吸引排出をくり返してから, stainless steel mesh (#60 および #150 を重ねたもの) を通過させた。細胞懸濁液を 10 $^{\circ}$ ~20 $^{\circ}$ C で 1,200rpm, 3 分間遠心し, Hanks 液でさらに 2 回洗浄を行った。つぎに, pellet に 1.5M 蔗糖溶液

を加え均一に懸濁させその上に1.2Mおよび0.8Mの蔗糖溶液を静かに重層した。これを1,200rpmで20℃, 10分間遠心したのち, 直ちに0.8Mと1.2Mおよび1.2Mと1.5M溶液層の間にある細胞をcapillary tubeを用いてそれぞれ集め, Hanks液で2回, Eagle's MEMで1回洗浄した。細胞数はBürker-Türkの血球計算盤を用いて計測した。倒立型位相差顕微鏡(Model IMTおよびPM-10-A, Olympus)を用いて分離細胞を観察し, 撮影を行った。

4. 分離細胞の黄体ホルモン分泌

分離細胞をEagle's MEMで $0.1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個/mlとなるように希釈し, 2.0×4.8 cmのバイアルに0.5~1.0ml宛分注した。これを透明なアクリル樹脂で覆った恒温槽中に置き, 95%O₂-5%CO₂環境下, 37℃で2~18時間のincubationを行った。遠心により細胞を除去し, mediumを蒸留水で20倍に希釈してステロイド測定まで-80℃に保存した。

5. 黄体ホルモンの定量

Progesterone (PRG) および20 α -dihydroprogesterone (20 α -DHP)のradioimmunoassay (RIA)はLindner⁷⁾および牧野⁹⁾の方法に従って行った。PRG測定には希釈したmediumの10~25 μ lを使用した。これを0.8mlのhexaneで20秒間抽出後, 窒素ガスでhexaneを蒸発乾固させ, 抗PRG血清0.5mlと室温で30分間, 続いて³H標識PRG (10,000dpm/0.1ml)を加えて37℃, 60分間incubationを行った。Dextran coated charcoal (DCC)を4℃で添加したのち3,000rpm, 15分間遠心後上清の0.5mlの放射能を測定した。20 α -DHPの場合にはmedium10 μ lに50mM Tris-HCl buffer pH8.0を90 μ lおよび抗20 α -DHP血清0.4mlを加えて室温で30分間, ついで³H標識20 α -DHP (10,000dpm/0.1ml)を加えて37℃, 90分間incubation後, DCCを加え遠心後上清0.5mlの放射能を測定した。PRGでは最低感度20pgから1,000pgまで, 20 α -DHPでは0.2ngから20ngまでの良好な標準曲線が得られた。同一測定日に10検体の測定を行って求めた測定内変動係数はPRGでは9.3%, 20 α -DHPでは6.7%であった。一方, 日を変えて同一検体を5回測定して求めた測定間の変動係数はPRGでは12.7%, 20 α -DHPでは9.2%であった。なお, hexaneによるmedium中のPRG抽出率は5倍および20倍希釈MEMを用いた場合, それぞれ79.8%および80.3% (いずれもn=10)であった。

結 果

1. 実験動物

22日令の幼若メスラットにPMS 25IU (a.m. 10:00)を注射した結果, 2日後のp.m. 8:00-11:00に血中のLHレベルがピークに達し, 3日目の午前中に約85%のラットで排卵を認めた。注射後4~8日目の各卵巣に形成された黄体ホルモン分泌細胞を逐日的に分離し, ageの異なる細胞のsteroidogenesisを観察した。

2. 黄体ホルモン分泌細胞の調製

蔗糖密度勾配遠心法で得た三つの細胞層を図1に示すように比重の小さい方からS-1画分, S-2画分およびS-3画分とした。

図2にPMS注射後6日目の卵巣から分離したS-1およびS-2画分の位相差顕微鏡写真を示す($\times 200$)。S-1画分は直径25~40 μ のはほぼ球形の黄色の細胞でその表面には多数の小さな突起が存在し, また, 泡状の粒子が付着しているのが認められた。Hematoxylin-Eosin染色では5~8 μ の直径を有する核および比較的大きな原形質が観察された。S-2画分の直径は15~25 μ で細胞の表面で

はやはり小突起や泡状粒子が付着しており，S-3画分には直径およそ 10μ の多数の球形細胞，赤血球および白血球などが観察された。Trypan blue 試験により細胞生存率は約85%であった。

卵巢一対当りのS-1およびS-2画分の各細胞の収量は図3に示す。S-1細胞での収量はPMS投与後6日目で $(10.8 \pm 2.5) \times 10^5$ 個と最大値に達した。S-2細胞は3日目においては $(4.8 \pm 0.35) \times 10^5$ 個とS-1の2.25倍であったが，4日目には $(3.9 \pm 0.32) \times 10^5$ 個とほぼ同数になり，5日目以後漸次減少した。

Fig. 1. Sucrose density gradient pattern of ovarian slices digested with enzymes. Two tenth % trypsin solution containing 0.2% of collagenase was used for the digestion for 45 min at 37°C . Centrifugation was conducted at $250\times g$ for 10 min.

Fig. 2. Phase-contrast microscopic photographs of isolated luteal cells collected by sucrose density gradient ($\times 200$). (a) S-1 cells and (b) S-2 cells from the rat ovaries removed on day 6 after the PMS treatment.

Fig. 3. Cell counts (means $\pm$ SD) of S-1 (●—●) and S-2 (○—○) layers isolated from a pair of ovaries of the PMS treated rats. A single dose of 25IU PMS was injected to 22-day-old female rats. (n=7 per group)

Fig. 4. Progesterone (a) and 20 α -dihydroprogesterone (b) production by isolated cells from the rat ovaries removed on day 4, 6 and 8 after the PMS treatment. The incubations of S-1 (●—●) and S-2 (○—○) cell suspensions were conducted at 37°C in Eagle's MEM.

Fig. 5. Effect of hCG on progesterone production by isolated luteal cells from ovaries removed on day 6 after PMS. Hormone-releasing activity is expressed as μg per 10^5 cells during 18 h-incubation. (a) S-1 cells (b) S-2 cells, C= Control group without hCG. Values are mean $\pm$ SEM. * $p < 0.005$, * $p < 0.025$ compared to the corresponding controls.

3. 分離細胞の黄体ホルモン分泌能

S-1およびS-2画分の細胞懸濁液を 37°C でそれぞれ, 2, 4, 6および8時間 incubate した。その時 medium 中に放出された 1×10^5 個細胞当りのPRGおよび 20α -DHPの量を図4に示す。

S-1画分のPRG分泌能はPMS注射後4日目において18時間 incubationにより $174 \pm 34 \text{ ng} / 1 \times 10^5 \text{ cells}$ であったが, 6および7日目ではそれぞれ 428 ± 44 および $222 \pm 24 \text{ ng} / 1 \times 10^5 \text{ cells}$ と増加し, 8日目で $128 \pm 13 \text{ ng} / 1 \times 10^5 \text{ cells}$ と減少した。 20α -DHPについてもPMS注射後4日目では18時間 incubationにより $6.90 \pm 0.52 \mu\text{g} / 1 \times 10^5 \text{ cells}$, 6および8日目ではそれぞれ 7.90 ± 0.69 および $2.75 \pm 0.31 \mu\text{g} / 1 \times 10^5 \text{ cells}$ となった。また, S-2画分の細胞による黄体ホルモン分泌能はS-1細胞に比較して低く, 8時間 incubationでPRGは37.0~48.0%, 20α -DHPは12.7~64.6%の分泌量であった。なお, S-3画分の細胞によるPRG分泌量は $7.0 \pm 0.53 \text{ ng} / 1 \times 10^5 \text{ cells}$ (6日目) 以下であった。

S-1およびS-2画分のPRG分泌に対する, hCGの効果を図5に示した。分離黄体細胞のPRG分泌はhCG ($0.1 \sim 10 \text{ IU} / 10^5 \text{ cells}$) によって有意に (S-1: $p < 0.005$, S-2: $p < 0.025$) 促進された。

考 察

卵巢は下垂体前葉から分泌される蛋白質ホルモンの支配を受けている。正常な性周期をもつ哺乳動物において黄体が形成されてから退縮するまでの期間中, 黄体細胞の前葉ホルモンに対する反応

性は経日的に変化していくものと考えられる。蛋白質ホルモンに対する黄体細胞の反応を *in vitro* でみるためには黄体ホルモン分泌細胞を分離して使用することが望ましい。この際の細胞はまた同一の生理的条件のものでなければならない。このような目的の実験では PMS あるいは PMS と hCG を投与した幼若ラットが用いられている^{6) 14) 13) 4) 1)}。本実験では体外からの諸因子の影響をできるだけ避けるため PMS のみの投与方法を用いた。

ラット卵巢から collagenase 消化によって黄体細胞を分離する方法は Strauss¹³⁾ や Conti⁴⁾ などが報告している。また、霊長類に関しては、Gulyas⁵⁾ が Macaca Mulatta の、Stouffer¹²⁾ は Macaca fascicularis の黄体から、ヒト黄体に関しては、Williams¹⁵⁾ および Richardson¹¹⁾ などがそれぞれ黄体細胞を分離した報告がみられる。これらの方法ではいずれも組織切片を collagenase などで消化後ガーゼ濾過によって残存組織片を除去し、細胞浮遊液を得ている。ヒトやサルでは形が大きいため摘出した黄体のみを酵素処理することが容易なので細胞の純度は高い。これに対してラットの卵巢は小さいため結合組織や卵胞を完全に除去するには可成りの時間を必要とする。したがって多数の黄体を採取する場合にはこれら他の組織が残存したものを使用せざるを得ず、目的物以外の細胞の混在を避けることが難しい。この点を改良するため密度勾配遠心法による分離法を検討した。最近、種々の細胞を比重に従って分画する方法が広く行われている。すなわち Okeda¹⁰⁾ は、Ficoll-Conray gradient 法を用いて脾臓から Langerhans 島細胞を分離し、McNamara⁸⁾ はラット卵巢黄体細胞の単離に Percoll 密度勾配遠心法を、さらに Conn³⁾ および Browning²⁾ はそれぞれ Metrizamide および Percoll 密度勾配遠心法を用いて Leydig 細胞の単離を行っている。今回の実験で卵巢の細切片を酵素消化する場合、collagenase のみでは黄体細胞の収量も低く良好な結果は得られなかった。Trypsin および DNase は cell clumps の分散を促進し、単一細胞率を上昇させるといわれている⁵⁾ ので、collagenase とともに使用した。また組織を消化したのち Teflon homogenizer で軽く押し潰す操作を試みたが、この操作によって黄体細胞は酵素消化を受けた卵巢組織内の基質や細胞間の結合組織から効率よく分離されたものと思われる。この結果、卵巢組織 100mg 当り S-1 画分では $2.31 \sim 9.23 \times 10^5$ 個、S-2 画分では $0.54 \sim 4.82 \times 10^5$ 個の収率となった。

今回の実験では、密度勾配に 0.8~1.5M というきわめて高濃度の蔗糖溶液を使用したので浸透圧のため細胞が若干収縮してみえた。しかし、分画後に Hanks 液で洗浄を行うと細胞の大きさも回復し、細胞表面の形態も分離前と比較して変化が認められず、光学顕微鏡的には蔗糖によって殆んど損傷がなかった。また、図 5 に示すように hCG に対して有意の PRG 分泌促進効果がみられたことから、黄体細胞の機能が保持されていると考えられる。蔗糖密度勾配法による黄体細胞の分離はきわめて clear であり、分離後洗浄すれば、蔗糖溶液を簡単に除去することができるという利点がある。

卵巢 1 対当りの S-1 画分の収量は PMS 投与後 5、6 日目が最も多いが同時に細胞数 1×10^5 個当りの PRG および 20α -DHP の分泌量も最大となった。この結果から gonadotropin 投与による個体の血中黄体ホルモンの増加は個々の細胞当りのホルモン分泌能と、形成される細胞数の両方がともに増加することによるものと考えられる。このような S-1 画分の細胞数の推移に対して S-2 画分のそれは、PMS 投与後 3 日目において S-1 の 2.3 倍量存在していたが、4 日目にはこれとほぼ同数となり、以後減少する一方であった。この実験結果は、gonadotropin による黄体細胞の成熟過程において S-2 細胞が S-1 細胞へ移行していく可能性をも推察させる。すなわち、黄体ホルモン分泌能が高まるにつれて比重の小さい細胞 (S-1 画分) が増加するものと考えられた。本法により分離された

S-1およびS-2画分がそれぞれ莢膜細胞由来か顆粒膜細胞由来であるかは興味のある点であるが、現在のところ明らかではない。

分離された黄体ホルモン分泌細胞の表面はきわめて起伏に富んでいるが、表面に存在する多数の小突起や表面に付着する泡状の粒子などの形態は卵巢組織切片のHematoxylin-Eosin染色標本においては観察できなかった。黄体ホルモン分泌の旺盛な時期におけるこれら細胞表面の小突起や付着粒子とステロイドホルモン分泌との関係については明らかではない。

ラット卵巢よりの黄体ホルモン分泌細胞の分離方法としてcollagenase消化と蔗糖密度勾配遠心法を組合わせた本法はreproductionに関する研究において有用であると考ええる。

結 語

1 排卵後の日数の明らかな黄体におけるsteroidogenesisにおよぼす、蛋白質ホルモンの影響をin vitroで定量的に観察するため、22日令のSD系メスラットにPMS 25IUを投与後、4日目以後の卵巢から、黄体ホルモン分泌細胞を分離する方法を検討した。

2 採取した卵巢から、卵胞や結合組織などをできるだけ除去した。これを細切して0.2%collagenase処理後、軽く押し潰したものを蔗糖密度勾配にかけ、黄体ホルモン分泌細胞S-1およびS-2を得た。S-1画分の細胞は活発に黄体ホルモンをmedium中に放出し、PMS後6日目の細胞PRGの放出量は $430\text{ng}/10^5\text{cells}/18\text{h}$ であった。S-2画分はS-1画分の40~50%のPRGを放出した。両画分とも0.1IUのhCGにより有意のPRG分泌促進効果を受け、生理的な機能を保持していると考えられた。

3 分離黄体細胞は直径 $15\sim 40\mu$ で表面には多数の小突起が存在し、泡状の粒子が付着しているのが光顕レベルで認められたが、これらの構造とステロイドホルモン分泌との関係はこの実験の範囲では明らかでない。

稿を終えるに臨み、細胞分離法に関して、種々の有益な御助言を賜りました大分医科大学高木良三郎教授、小野順子博士および九州大学医学部桶田俊光博士に深謝致します。

本実験に御協力頂いた東京理科大学理学部小熊義宏学士に心から感謝致します。

本研究の一部は昭和56年第54回日本内分泌学会総会(岡山)において発表した。

文 献

- 1) Behrman, H.R., Preston, S.L. and Hall, A.K.: Cellular mechanism of the antigonadotropic action of luteinizing hormone-releasing hormone in the corpus luteum. *Endocrinology*, 107: 656-664, 1980.
- 2) Browning, J.Y., D'Agata, R. and Grotjan, H.E., Jr.: Isolation of purified rat Leydig cells using continuous Percoll gradients. *Endocrinology*, 109: 667-669, 1981.
- 3) Conn, P.M., Tsuruhara, T., Dufau, M. and Catt, K.J.: Isolation of highly purified Leydig cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology*, 101: 639-642, 1977.
- 4) Conti, M., Harwood, J.P., Dufau, M.L. and Catt, K.J.: Effect of gonadotropin-induced receptor regulation on biological responses of isolated rat luteal cells. *J. Biol. Chem.*, 252: 8869-8874, 1977.
- 5) Gulyas, B.J., Yuan, L.C. and Hodgen, G.D.: Progesterone production by dispersed monkey (*Macaca Mulatta*) luteal

- cells after exposure to trypsin. *Steroids*, 35: 2542–2551, 1980.
- 6) Hillensjö, T., Bauminger, S. and Ahren, K.: Effect of luteinizing hormone on the pattern of steroid production by preovulatory follicle of pregnant mare's serum gonadotropin-injected immature rats. *Endocrinology*, 99: 996–1002, 1976.
- 7) Lindner, H.R., Perel, E., Friedlander, A. and Zeitlin, A.: Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier. *Steroids*, 19: 357–375, 1972.
- 8) McNamara, B.C., Booth, R. and Stanfield, D.A.: Purification and steroidogenic responses of isolated rat luteal cells. *International Union of Biochemistry Meeting, Toronto*, 1979.
- 9) 牧野拓雄: 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay, *日内分泌誌*, 49: 629–645, 1973.
- 10) Okeda, T., Ono, J., Takaki, R. and Todo, S.: Simple method for the collection of pancreatic islets by the use of Ficoll-Conray gradient. *Endocrinol. Japon*, 26: 495–499, 1979.
- 11) Richardson, M.C. and Masson, G.M.: Progesterone production by dispersed cells from human corpus luteum: Stimulation by gonadotrophins and prostagrandin $F_{2\alpha}$; Lack of response to adrenaline and isoprenaline. *J. Endocrinol.*, 87: 247–254, 1980.
- 12) Stouffer, R.L., Nixon, W.E., Gulyas, B.J., Johnson, D.K. and Hodgen, G.D.: In vitro evaluation of corpus luteum function of cycling and pregnant Rhesus monkeys: Progesterone production by dispersed luteal cells. *Steroids*, 27: 543–551, 1976.
- 13) Strauss, J.F. and Flickinger, G.L.: Phospholipid metabolism in cells from highly luteinized rat ovaries. *Endocrinology*, 101: 883–889, 1977.
- 14) Taya, K. and Greenwald, G.S.: Postovulatory steroidogenesis after PMS-induced ovulation in immature female rats. *Am. J. Physiol.*, 241: E221–E225, 1981.
- 15) Williams, M.T., Roth, M.S., Marsh, J.M. and LeMaire, W.J.: Inhibition of human chorionic gonadotropin-induced progesterone synthesis by estradiol in isolated human luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 437–440, 1979.

(受付日: 57. 7. 20)