器官培養におけるヒト胎盤絨毛のviabilityに関する研究

東京大学医学部産科婦人科学教室

(指導: 坂元正一主任教授)

荻野満春, 佐藤正仁, 木下勝之
佐藤和雄, 水野正彦The Viability of Human Chorionic Villi
in Organ CultureMitsuharu OGINO, Masahito SATOH, Katsuyuki KINOSHITA,
Kazuo SATOH and Masahiko MIZUNODepartment of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine,
University of Tokyo,
Tokyo, Japan

Director: Professor-Chairman, Shoichi Sakamoto

The method and technique of organ culture of human chorionic villi was elaborated in our laboratory. In this report, placental specimens obtained at 15 to 18 weeks of gestation were studied in organ culture for 7 days in terms of the maintenance of morphological integrity and the preservation of functions.

The morphological aspect of the viability of the various villous elements with special emphasis on the trophoblast cells was described histologically and ultrastructurally. The functional aspect of the viability was discussed by analysis of the suppressive effect of the cultivated villi on plasminogen activator (PA) secretion by OK-432 elicited mouse peritoneal macrophages, by analyses of the activity of Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase coupled with Δ^5 - Δ^4 -isomerase (HSD) and of the radioactivity of [125 I]-Iododeoxyuridine ([125 I]-IUdR) retained in the DNA of the trophoblast cells.

Specimens of normal placenta were obtained at the time of induced abortion. The gestational ages were 15, 16 and 18 weeks. Specimens for organ culture were prepared under sterile conditions within one hour after expulsion of the placenta. Through gross dissection, the villi were isolated and minced into fragments of approximately 1 to 2 mm³. Incubation was carried out at 37°C in a conventional static chamber with a gas mixture of 95% air, 5% CO₂. The culture dishes and culture media were renewed every day. Data are the mean values of the duplicate incubations.

In the first series of organ culture, placental fragments were removed at the end of each day of incubation, washed thoroughly and transferred to the new dishes with a culture medium freed from fetal bovine serum, where further incubation was performed for 24

hours. After this, placental fragments were fixed in 4% neutral buffered formalin, processed through paraffin embedding, serially sectioned at $5\mu\text{m}$ and stained by periodic-acid Schiff (PAS) procedure. Culture medium obtained in this series at each end of incubation was put into a "macrophage plate" with the addition of plasminogen in the concentration of 2 IU/ml, in which OK-432 elicited mouse peritoneal macrophages with the capacity to secrete PA were cultured. Reaction was terminated at 24 hours unless otherwise indicated. Ten μl of the medium in the "macrophage plate" was applied to the fibrin plate, and reaction was performed for 18 hours. PA activity was expressed by plasmin activity converted from plasminogen measured by the single radial immuno-diffusion method. The suppressive effect of the villi on PA secretion was examined and expressed as per cent of the PA activity against the control, which was measured by adding only bovine serum free medium to the "macrophage plate" by the same procedure as previously described.

In the second series, placental fragments were removed at the end of each day of incubation, washed thoroughly and transferred to the new dishes with a culture medium containing 1.75 n moles ($0.1\mu\text{Ci}$) of $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-5-pregnen-3}\beta\text{-20-one}$ ($[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-P}_5$; S.A. 57.2 mCi/m mole) as the substrate for HSD. Incubation was terminated at 20 hours unless otherwise indicated, and extraction of steroids was carried out with dichloromethane from the medium. The extracts were chromatographed on a silica gel thin layer plate, and radioactive regions were detected by a β -chromatogram camera. Placental fragments obtained in this series were homogenized by sonication for protein determination by the Lowry method with bovine serum albumin as standard. The activity of HSD was expressed as $\times 10^{-11}$ moles/mg protein/hour.

In the third series, $1.0\mu\text{Ci}$ of $[^{125}\text{I}]\text{-IUdR}$ (S.A. 2,000 Ci/m mole) was added to the culture medium prior to the cultivation, and radioactivity retained in the DNA of the trophoblast cells was assayed every day. Placental fragments in this series were treated in the same way as in the second series for protein determination. The radioactivity retained in the DNA of the trophoblast cells was measured by the TCA method and expressed as cpm/mg protein.

In the final series, electrone microscopy was applied to observe the functional morphological properties of the cultivated villi and to evaluate the relationship between morphology and function.

Morphological integrity was evaluated by the histological scores according to a modification of the original method by Hustin & Gespard. It was revealed that the chorionic villi did not show any significant morphological changes in an *in vitro* environment until the 4th day of cultivation. A significant degree of suppressive effect on PA by the cultivated villi was observed from the 1st to the 5th day of cultivation, but on the 6th and 7th day it declined remarkably. The radioactive product from $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-P}_5$ was only progesterone, which was identified by repeated crystallization. The activity of HSD ranged between 4.50 and 7.35×10^{-11} moles/mg protein/hour during the entire course of cultivation. Day to day differences were not statistically significant. Radioactivity of $[^{125}\text{I}]\text{-IUdR}$ retained in

the DNA of the trophoblast cells was preserved within the first 4 days, whereas it declined rapidly thereafter. Electron microscopical examination showed that such structures as the nucleus, endoplasmic reticulum and mitochondria in the cytotrophoblasts were viable, while in the syncytiotrophoblasts these structures had undergone thorough degenerative changes suggesting less functioning property. These findings would indicate that the cytotrophoblasts are more responsible for the functions previously described than the syncytiotrophoblasts at least in an *in vitro* environment.

It is suggested that the former exerts the functions as mentioned above without morphological differentiation to the latter. It is also assumed that the radioactivity of [^{125}I]-IUdR observed in the villi is mainly in the cytotrophoblast, since the nuclei of the syncytiotrophoblast underwent thorough degeneration. Finally, it is concluded that the human chorionic villi in our organ cultures maintained morphological integrity and preserved normal functions at least until the 4th day of cultivation.

緒 言

胎盤絨毛の機能を母体・胎児から独立させて詳細に研究する実験系として、培養法は極めて優れた方法であると考えられる。ヒト胎盤絨毛の培養には、Trowell²⁴⁾、Tao²³⁾らのstatic chamberによる器官培養法、あるいはrocker platform chamberを用いより好条件のもとで器官培養を行ったChung⁶⁾、Huot¹⁵⁾らの研究がある。また、Hall¹³⁾あるいはStromberg²²⁾、Cotte⁸⁾らによるmonolayer cell cultureの報告もある。

そこで、器官培養法とmonolayer cell cultureとの優劣を考察してみると、まず器官培養法については、その利点は特殊な薬物処理を行うことなく培養でき、可及的intactな状態で、しかも一定期間絨毛の組織構築を保ちつつ培養することができると考えられることである²⁾。また、絨毛組織の各構成成分の相互関係は、*in vivo*におけるのと同じ状態に維持できることが期待できる。従って、培養中容易に細胞の形態的同定も行なえると思われる。

他方、monolayer cell cultureでは、通常trypsin, EDTA, DNAaseなどの薬物処理が行われる。このため、これらの薬物が細胞膜特性などに変化を及ぼす可能性が考えられる²²⁾。また、血球成分の除去に際して行なわれる遠心分離あるいはFicoll-Hypaqueを用いた濾過などの操作も細胞に影響を及ぼす可能性がある⁸⁾。しかも、絨毛細胞間の相互関連は全く失われ、“増殖型細胞”であるcytotrophoblast（以下CT）、および“機能型細胞”であるsyncytiotrophoblast（以下ST）は、培養によりmetamorphosisをおこし、CTはepitheloid cellに、またSTはpolynucleated cellにその形態を変えてゆくといわれる¹⁸⁾。また、ある報告では¹⁹⁾、CTは培養環境でもgerminative cellとしてSTへ形態分化してゆくこともあり、その過程として種々の形態を示す細胞が出現し、細胞の形態的同定は極めて困難になるとされている。更に、またmonolayer cell cultureを開始するまでに要する時間は、器官培養の場合と比べて2～3倍も長くかかり、この間における細胞の変性も無視し得ないものと考えられる。

以上より、ヒト胎盤絨毛を*in vitro*でできるだけ生理的条件下で観察をするには、器官培養法がmonolayer cell cultureより種々の点で優れていると考えられる。そこでわれわれは、Trowell²⁴⁾、

Tao²³, Franchimont¹¹⁾, Huot¹⁵⁾らの方法を独自に改良し、ヒト胎盤絨毛の器官培養法を行なった。そして、第1に組織構築の変化を培養開始後7日目まで逐日的に観察し、絨毛の各構成成分のおおのについて形態的評価を行った。また、第2に培養期間における絨毛の機能をいくつかのparameterに沿って評価し、培養開始後どの位の期間機能が維持されるかについて検索する一方で、電顕的観察も行って、機能と形態との関連性について検討した。

一般に、機能は一定の形態に依存して作動すると考えられているが、in vitro の条件下では、この機能の形態依存性にいかなる変化が生ずるかは、極めて興味深い基礎的な課題である。われわれは、こうした問題をわれわれが開発した器官培養法により検討し、またこれを通じて培養絨毛のviabilityが、培養開始後どれ位の期間維持されるかについて一定の見解を得たいと考えた。

対象ならびに方法

1) 対象： 妊娠15, 16ならびに18週の各時期にPGE₁膈錠による人工中絶で得られた新鮮な胎盤を用いた。これらの症例は、妊娠経過に全く異常がなく、児娩出直前まで電子スキャンにより胎児心拍が確認されており、胎盤は児娩出後に自然剝離したものである。

2) 培養組織の採取： 胎盤は、娩出後無菌的に取り扱い、まず母体面を観察し、特殊な所見を示す部分は避け、できるだけcentral zoneに位置すると思われるcotyledonから、2～3 cm角程度の大きさの組織を採取した。central zoneを選んだのは、この部位が機能的に最も重要な部分であるからである²⁰⁾。次に、採取した組織を4℃のHanks' balanced salt solution (HBSS; pH = 7.410–7.420) に入れ、まず母体面から3～5 mmの厚さのbasal plateを含む層を取り除き、絨毛組織のみとした。なお、これが絨毛組織のみであることは、この実験に先立つ組織学的検索により確認してある。その後、組織は更にいくつかの組織片に細切し、HBSSで充分に洗浄して、血液や羊水を除去した。次に、細切した組織片を1/100 cmの対物スケールを装着した実体顕微鏡下におき、更に1～2 mm³大の小組織片に細切し、これを器官培養に供した。

3) 器官培養法： culture dishにはFalcon 3037 (Becton, Dickinson and Co)を用いた。culture dishのouter wellには、加湿の目的で生理的食塩水を入れ、center wellには450 μ lの後述する内容のmediumを加えた。次いで、center wellにstainless steel organ culture grid (Falcon 3014, Becton, Dickinson and Co)を載せ、その上に、supporting matrixとして径1.2 μ mのmillipore filter (Gelman Instrument Co., USA)を置いた。mediumは、nutrient mixture F-10 (GIBCO)にfetal bovine serum (fbs; GIBCO)を20%, kanamycin sulfate (武田製薬)を80 μ g/mlの濃度で添加して使用した。培養は、37℃で、95% air, 5% CO₂のstatic chamberで行った。培養期間は、1日間(D₁)、2日間(D₂)、3日間(D₃)、4日間(D₄)、5日間(D₅)、6日間(D₆)および7日間(D₇)の7種類とした。なお、culture dishとmediumは連日交換し、新しいものと取り換えた。

4) 培養による観察：

実験 1) 1日間から7日間の培養系列それぞれについて、培養終了後supporting matrixと共に培養組織を取り出し、充分に洗浄しfbs freeのmediumを加えた新しいculture dishに移し、この中で更に24時間incubationを行った。incubation終了後、培養組織はsupporting matrixと共に、4% neutral buffered formalinで固定し、固定後paraffin包埋して5 μ mの連続切片を作り、periodic-acid-Schiff (PAS) 染色を行った。観察は、各組織標本につきcross sectionを示す絨

毛を随意に選び, 結果は Table. 1 に示すような histological score (Hustin & Gespard¹⁶⁾ の score をわれわれが一部改変したもの) により表わし, 5 つの絨毛での結果の平均値を求めた。絨毛組織の構成成分としては, ST, CT, core stroma ならびに villous capillary を観察した。

次に, 組織を取り出した後の medium は plasminogen activator (PA) 活性の測定に供した。すなわち, その 50 μ l と 2 IU/ml の濃度の plasminogen (第一製薬) を同時に “macrophage plate”⁵⁾ の well 内に加え, 24 時間 incubation を行った。この後, well 内の溶液 10 μ l を fibrin plate (北里バイオ・ケミカル) の pore に入れ 18 時間反応させた。そして, plasminogen からの転換による plasmin 活性を single radial immunodiffusion method により PA 活性の指標とした⁵⁾。また, 対照には fbs free の medium と 2 IU/ml の濃度の plasminogen のみを “macrophage plate” で反応させたものを使用した。なお, PA 活性は対照値を 100 とした場合の % として表わした。

実験 2) 1 日間から 7 日間までのそれぞれの培養系列で, 培養終了後 supporting matrix と共に培養組織を取り出し, 十分に洗浄し, 新しい culture dish に移して更に 20 時間の incubation を行った。incubation 開始時, 各々の dish の medium (450 μ l) に $[4-^{14}\text{C}]-5\text{-pregnen-}3\beta\text{-}20\text{-one}$ ($[4-^{14}\text{C}]-\text{P}_5$; S.A. 57.2 mCi/m mole, NEC 375) を 1.75 n moles (0.1 μ Ci, ethanol 量として 5 μ l) を添加した。incubation 終了後, medium は, HSD 活性 ($\Delta^5\text{-}3\beta\text{-hydroxysteroid dehydrogenase}$, $\Delta^5\text{-}\Delta^4\text{-isomerase}$) の測定に供した。なお, $[4-^{14}\text{C}]-\text{P}_5$ の純度は thin layer chromatography (TLC) により検索したところ, 98.3% であった。medium からのステロイドの抽出は, 約 2 倍量の dichloromethane の添加により 3 回行った。抽出液には, pregnenolone (P_5 ; Sigma Chemical Co) 50 μ g, progesterone (P_4 ; Sigma Chemical Co) 20 μ g, $20\alpha\text{-dihydroprogesterone}$ ($20\alpha\text{-OHP}_4$; Sigma Chemical Co) 20 μ g を各々 marker として添加し, TLC plate にのせ isopropyl ether : petroleum ether : acetic acid (70:30:2, vol/vol) で 3 回展開した。展開後, $\beta\text{-chromatogram camera}$ (Aloka, BCC-101 B) により radioactive regions を検出し, marker として加えたステロイドに一致した region を TLC plate より削り取り, chloroform : methanol (2:1, vol/vol) で溶出し, radioactivity を scintillation counter (Aloka, LSC-700) にて測定した。そして, 各ステロイドの量を加えた基質量の radioactivity に対する比率より算出した。また, incubation 終了後の培養組織は sonication により破碎し, homogenate の一部は bovine serum albumin を標準蛋白として Lowry 法により蛋白定量を行った。HSD 活性は, $\times 10^{-11}$ moles/mg protein/hour として表わした。

実験 3) この実験では培養開始時に, medium 中に $[^{125}\text{I}]\text{-Iododeoxyuridine}$ ($[^{125}\text{I}]\text{-IUdR}$; S.A. 2000 Ci/m mole, NEX 072) を 1.0 μ Ci 添加し, $[^{125}\text{I}]\text{-IUdR}$ を培養絨毛の trophoblast の DNA に取り込ませた。培養期間は, 1 日間から 7 日間の 7 種類とした。培養 1 日間のものについては, 培養終了後の組織は直ちに後述する radioactivity の測定に供した。2 日間以上の培養群については, 1 日間の培養終了ごとに組織を supporting matrix と共に取り出し, 5 槽の洗浄液に順次通して洗浄し, 新しい culture dish に移した。このような方法により, 培養 1 日から 7 日までのそれぞれにおける培養組織中に存在する radioactivity を測定した。測定にあたっては, まず培養組織を sonication により破碎し homogenate とした。homogenate の一部は, 実験 2 と同様の操作により組織の蛋白定量に供した。そして, 残りには trichloro-acetic acid (TCA) を 5% の濃度となるように加え, よく攪拌し 800 G で 5 分間遠心して, まず上清 (sup 1) を分離した。更に, 5% TCA で沈渣を洗浄後, 800 G で 5 分間遠心して, 再び上清 (sup 2) を分離した。そして, 2 回目の

遠心により得られた沈渣ならびに sup 1, sup 2 の radioactivity を auto well gamma counter (Aloka, ARC-251) で測定した。測定結果は, cpm/mg protein で表わした。

実験 4) 培養開始後 1 日から 4 日までの培養組織を電顕的観察に供した。すなわち, 培養終了後 supporting matrix と共に培養組織を取り出し, 固定は 0.1M cacodylate buffer (pH=7.120) で調製した 2.5% glutaraldehyde と 4.0% paraformaldehyde を含む溶液で用いて行った。後固定は, 0.1M cacodylate buffer で十分に洗浄した後, 1.0% osmium tetroxide で行った。

包埋は, Epon 812 によった。観察は, 800 Å の超薄切片につき, H-700 (日立製作所) 透過型電子顕微鏡で行った。

Fig. 1-a Left: The villi of the placenta prior to the cultivation. The stroma is poor in fibrous and mesenchymal components. (X 100)
Right: Hofbauer cell and a few villous capillaries are observed in the stroma. The cytotrophoblast with PAS negative cytoplasm are seen (shown by arrows). (X 400)

Fig. 1-b Left: The stroma of the villi on the 4th day of cultivation is rich in fibrous components and PAS positive deposits. (X 100)
Right: The villus on the 4th day of cultivation is shown. Compared with the control villus (Fig. 1-a), the stroma is dominantly occupied by fibrous and PAS positive components. The cytoplasm of the cytotrophoblast (shown by an arrow) takes PAS staining avidly. (X 400)

Fig. 1-c The villi on the 5th day of cultivation are shown. The trophoblastic layer is partially detached from the underlying stroma by vacuole formation. (X 200)

Table 1. Histological scores modified after Hustin & Gespard (1977).

(A) TROPHOBLAST CELL

A-1: SYNCYTIOTROPHOBLAST (ST)

- Grade 4 Syncytiotrophoblastic layer retained intact.
- 3 Syncytiotrophoblastic layer retained, but with syncytial knots formation to various degrees.
- 2 Syncytiotrophoblastic cells remain, but only scarcely recognized.
- 1 Syncytiotrophoblastic layer retained, but partially or completely detached.

A-2: CYTOTROPHOBLAST (CT)

- Grade 0 Cytotrophoblastic cells scarcely recognized.
- 1 Cytotrophoblastic cells occupy less than the half of the trophoblastic layer.
- 2 Cytotrophoblastic cells occupy more than the half of the trophoblastic layer.
- 3 Cytotrophoblastic cells replace the entire trophoblastic layer.

(B) STROMA

- Grade 0 Stromal collagen fiber and PAS positive deposits to a slight degree.
- 1 Stromal collagen fiber and PAS positive deposits to a moderate degree.
- 2 Stromal collagen fiber and PAS positive deposits to a high degree.

(C) VASCULATURE

- Grade 3 Villous vessels remain intact with blood cells within them.
- 2 Villous vessels seemingly narrowed, but still with blood cells within them.
- 1 Villous vessels moderately occluded.
- 0 Villous vessels completely occluded.

成 績

実験 1-1: 培養期間における組織構築の逐日的変化

まず、培養前の胎盤絨毛を組織学的に観察すると (Fig. 1-a), chromophilia を示す ST ならびに PAS negative の細胞質を有する CT が観察された。これは、妊娠 15~18 週の絨毛の特徴のひとつといえる。また、core stroma は粗であり、Hofbauer cell が観察された。core stroma には、villous capillary も 2~3 個みられるが、大部分は発達が不十分であった。

次に、培養後の形態変化を逐日的に検討した。培養 2 日目までは、組織所見は培養前のものとはほとんど変化がなかった。しかし、培養 3 日目になると、まず ST については、培養前の絨毛に比べ、chromophilia の減弱が認められるようになった。ST の chromophilia の減弱は、培養 4 日以降は、更に著明となった。次に、CT については、trophoblastic layer に占める割合が逐日的に増加し、培養 4 日目以降には全体の 50% 近くを占めるようになった (Fig. 1-b; right)。また、細胞質の PAS 染色性も強くなっていくことが観察された。他方、core stroma では、培養 4 日目になると fibrous components が増加し、PAS 陽性物質の蓄積が著明となってきた (Fig. 1-b; left)。また、villous capillary の変化は 5 日頃までは著明ではないが、6 日目以降にはほとんど認められなくなった。

ST, CT, core stroma の間の組織構築的關係は、培養 4 日目まではほぼ良好に維持されていたが、5 日目になると trophoblastic layer は vacuole 形成により、一部 core stroma から分離するのが観察された (Fig. 1-c)。この変化は、6 日目以降更に顕著となり、trophoblastic layer は core stroma から完全に分離した像を示すようになった。また、この時期には trophoblast cell の一部に pyknosis あるいは karyorexis の所見が認められるようになった。

Fig. 2. Histological scores of various villous components during the first 4 days following initiation of culture.

そこで、絨毛の組織構築の integrity が保持されている培養開始後 4 日間における組織の構成々分について、Table 1 に示したような histological score により評価したところ Fig. 2 のような結果が得られた。すなわち、まず ST については、培養を 4 日間行なう間に grade がやや低下する傾向があるが著明ではなく、組織学的に変性は極めて軽度であることがわかった。次に、CT については、培養日数を重ねるにつれて grade が増加し、培養 4 日目のものでは増加が更に著しくなることがわかった。core stroma は、3 日目まではほとんど変化しなかったが、4 日目になると stromal components が著明に増加することが観察された。また、villous capillary は、培養 4 日間はほとんど変化のないことが確かめられた。

Fig. 3. Suppressive effect of the cultivated villi on plasminogen activator (PA) secretion by OK-432 elicited mouse peritoneal macrophages. Data at different periods of cultivation are the mean values of duplicate incubations for each specimen.

Fig. 4-a The thin layer chromatogram taken by β -chromatogram camera on the left and schematic representation on the right.

Fig. 4-b Activities of HSD at different periods of cultivation. Data are the mean values of duplicate incubations for each specimen.

実験1-2: PA活性の逐日的推移

培養7日目までのPA活性の逐日的推移をFig. 3に示した。これからわかるように、PA活性は、培養開始後5日目までは30%以下と強く抑制され、その程度は妊娠15, 16, 18週と妊娠週数につれて著明となることがわかった。しかしながら、6日目になるとPA活性の抑制は急速に弱まり、それ以降は15週のものでは53%(D₆)、70%(D₇)、16週のものでは87%(D₆)、90%(D₇)、そして18週のものでは42%(D₆)、47%(D₇)となった。以上のことから、PA活性抑制物質の産生能は、培養開始後5日間は維持されているが、6日目を降急激に低下することがわかった。

実験2: 培養によるHSD活性の逐日的推移

まず、[4-¹⁴C]-P₅から合成された物質は、Fig. 4-aに示したように authentic な P₄ region に一致した物質のみで、authentic な 20 α -OHP₄ region に一致した場所に radioactivity は認められなかった。authentic な P₄ region に一致した物質は、再結晶法により P₄ と同定された。

次に、HSD 活性の逐日的推移は Fig. 4-b に示すようであった。すなわち、培養1日(D₁)から7日(D₇)までの間、HSD 活性は15週の絨毛では4.75~7.10 x 10⁻¹¹ moles/mg protein/hour、16週のものでは4.75~7.35 x 10⁻¹¹ moles/mg protein/hour、そして18週のものでは4.70~6.90 x 10⁻¹¹ moles/mg protein/hour の間にあり、培養期間中ほぼ一定に保たれていることがわかった。なお、いずれも2日目のHSD活性は若干高値を示したが、統計的には有意ではなかった。

Fig. 5. Radioactivity of [¹²⁵I]-IUdR incorporated into DNA of the trophoblast cells at different periods of cultivation. Data are the mean values of duplicate incubations for each specimen.

実験3: 培養による[¹²⁵I]-IUdRの逐日的推移

まず、組織の洗浄過程でDNAに取り込まれずに組織に付着した放射能が洗浄でどの程度除去されるかについて検討した。すなわち、1日間培養後の組織では、洗浄の第1槽では平均26182cpmであり、第2槽、第3槽と順次低下して第5槽では平均334cpmとなった。また、2日間以上培養した系列では、第3槽ではback ground (35cpm) 程度であった。なお、TCA法によるDNAに結合した[¹²⁵I]-IUdR抽出操作において得られたsup 1 + sup 2の合計のradioactivityは100cpm以下であった。

さて、1日間培養した組織の $[^{125}\text{I}]$ -IUdRのradioactivityは7650~8190cpm/mg proteinであるのに対し、2日間培養したものでは4545~4719cpm/mg protein、3日間のものでは2710~3240cpm/mg protein、4日間のものでは3168~3540cpm/mg proteinであった。したがって、radioactivityは培養2日目には有意に低下するが、2日から4日の間はほぼ一定であると言える。しかしながら、培養5日目には1080~1170cpm/mg proteinと低下し、その後は6日目、7日目と低いレベルが続いた(Fig. 5)。

Fig. 6-a The villus of the placenta prior to the cultivation is shown. Micro vacuoles are observed in the cytoplasm of the syncytiotrophoblast (ST). The cytotrophoblast (CT) beneath the syncytiotrophoblast appears normally functioning. (X 2,400)

Fig. 6-b The villus on the 1st day of cultivation is shown. Vacuolation in the cytoplasm of the syncytiotrophoblast becomes dominant. (X 2,400)

Fig. 6-c The villus on the 3rd day of cultivation is shown. Chromatin aggregation is recognized in the nucleus (N) of the syncytiotrophoblast and vacuolation becomes more prominent in the cytoplasm of the syncytiotrophoblast. The nucleus and organelles of the cytotrophoblast seem to be functioning. Basal lamina becomes thickened and lines in an irregular pattern. In the stroma of the villus, collagen fiber (CF) proliferation is observed. (X 4,000)

Fig. 6-d The cytotrophoblast on the 3rd day of cultivation is shown in high power. In one of the mitochondria, inclusion bodies appear (shown by an arrow). (X 12,000)

Fig. 6-e The villus on the 4th day of cultivation is shown. Vacuolation in the cytoplasm of the syncytiotrophoblast advances and dominantly occupies the cytoplasm of the syncytiotrophoblast. Pyknotic change becomes apparent in the nucleus of the syncytiotrophoblast. Morphological property of organellae in the cytotrophoblast is almost normal. Basal lamina highly thickens and its irregular lining is enhanced. The stromal components remarkably increase. (X 5,000)

Fig. 6-f The cytotrophoblast on the 4th day of cultivation is shown in high power. The organellae of the cytotrophoblast still retains morphologically functional property. (X 10,000)

実験4： 培養期間における絨毛の電顕的観察 (Fig. 6-a~f)

培養によっても、4日間はmicrovilliにはほとんど変化はなく、ほぼ正常の像を保っていることがわかった。STでは、逐日的にcytoplasmic vacuolationの進行する所見が認められた。また、培養開始前のSTの核 (Fig. 6-a) には、すでにchromatin aggregationが軽度みられた。しかし、1日間培養後のSTの核 (Fig. 6-b) には、chromatin aggregationは認められなかった。これは、chromatin aggregationが胎盤剥離後極めて速かに生ずること、また培養を行なうと最初の1日でchromatin aggregationをおこしたSTは消失し、新しいSTがCTから分化・形成されてくることを示すものと思われた。3日間培養すると、STの核内には再びchromatin aggregationが出現し (Fig. 6-c)、4日間のものではpyknosisの像が認められるようになった (Fig. 6-e)。また、STのorganellae、特にendoplasmic reticulum, ribosomes, mitochondriaなどは、培養開始後早期から変性をおこしてきて、3日目以降には、ほとんど電顕的に同定できなくなった。これに対して、CTの核は4日間の培養中良好に保たれていた (Fig. 6-a, b, c, e)。CTではorganellaeもほぼ良好に保たれるが、1日間培養により若干減少し (Fig. 6-b)、3日間培養後にはendoplasmic reticulumやmitochondriaなどの分布が増加してくるといった変化が観察された (Fig. 6-e, d)。また、3日間培養したものでは、mitochondriaの一部にinclusion bodyが認められた (Fig. 6-d)。4日間のものでは、endoplasmic reticulumやmitochondriaに若干の変形がみられるが、形態的には機能像を維持していることが確められた (Fig. 6-f)。

basal laminaは、逐日的に肥厚が著明となり、また走行不正が増強してきた。特に、3日、4日間培養したものに顕著であった (Fig. 6-c, e)。

core stromaでは、3日間培養したものに既にcollagen fiberの増生がみられ、この変化は4日目には更に著明となった (Fig. 6-c)。collagen fiberの増生とdepositsの増加は、培養4日目には、組織学的にも証明される程著明であった (Fig. 6-e)。

考 察

器官培養法の主たる目的は、基本的な組織構築をin vitroで保持させながら、できるだけ正常な機能を継続させることである²⁾。われわれは、この点を考慮して器官培養法を開発した。われわれの方法には、以下のような特徴があげられる。第1は、培養組織片が絨毛組織のみから成るように検体を採取したことである。第2には、supporting matrixとしてmillipore filterを使用して、培養後の組織切片作製を容易にしたことである。そして、第3に培養組織片がどの程度の大きさであれば、培養組織の細胞がnecrosisに陥ることなく培養できるかをあらかじめ検討し、1~2mm³の大きさを選定したことである。このような方法により、われわれは絨毛組織を7日間培養した。しかし、いかに培養条件の設定がよくても、in vivoと全く同様の状態を作ることは当然のことながら困難であり、限界がある。こうした限界を見極めることも今回の研究の主要なテーマのひとつである。そこで、培養組織のviabilityを形態ならびに機能の両面から検討した。

さて、trophoblast cellのうちCTは主に増殖細胞としての形態的な特徴を有しており、これに対してSTは主に機能細胞としての形態的な特徴を有している。しかも、CTは増殖と共にSTに形態分化してゆく特性を有していることから、STに分化した後に発現される機能を内在している可能性が推測される。一般に、機能は特定の形態に依存して作動すると考えられるが、in vitroの環境下で機能の形態依存性にいかなる変化が生ずるかということが、絨毛についても問題となる。

そこで、今回われわれは、器官培養した絨毛について、形態と機能の関連についても分析した。Taoら²³⁾は、器官培養した trophoblast cell の [^3H]-thymidine 取り込み動態を autoradiography により検索したところ、3時間培養のものでは [^3H]-thymidine は大部分CTに取り込まれるが、24時間培養したものでは、STにも radioisotope が証明されたとしている。この結果は、24時間の培養期間中にCTがSTに形態分化したことを示唆するものと考えられる。in vivoにおいても、CTがSTの germinative cell であることは種々の報告によって証明されている⁷⁾¹⁴⁾²¹⁾。われわれの器官培養においても、STの核は培養1日後ならびに2日後には、培養開始前のものと明らかに異なっており、CTから分化・形成されたことが示唆された。しかしながら、培養3日以降のものではSTは著明な変性像を示していた。これは、培養3日以降になるとCTはSTへの分化・形成能を失う可能性を示すものと考えられる。しかし、CTでは培養3日以降もほぼ正常な機能形態像が保たれていることがわかった。 [^{125}I]-IUdR の取り込み実験の結果も、このことを裏付けるものである。

(実験1-2)で用いた“macrophage plate”法は、OK-432により励起された $\text{C}_3\text{H}/\text{He}$ マウスの腹膜由来の macrophage を利用した実験系である⁵⁾。マウス腹膜由来の macrophage は、この実験系でPAを産生することが知られている⁹⁾。われわれは、この方法を用い、初期絨毛の protease inhibitor 合成能⁴⁾²⁵⁾が、培養期間中どのように推移するかを検討した。絨毛の protease inhibitor 活性は、macrophage のPA産生能を抑制する度合で表わし、これをPA suppressor 活性とよぶこととした。既に述べたごとく、PA suppressor 活性は培養5日間は維持されていたが、これは培養環境下においても trophoblast cell の細胞内蛋白合成器官の機能が、少なくとも5日間は保持されていることを示す事実と考えられる。

次にわれわれは、培養絨毛のHSD活性を P_5 の P_4 への転換を指標として検討したところ、7日間の培養期間中、ほぼ一定に維持されていることが確認された。HSDは、subcellular fraction の実験では、endoplasmic reticulum あるいは mitochondria に存在すると言われているが¹⁷⁾、われわれの成績も間接的にそれを支持する事実といえる。組織生化学的な研究によっても、HSD¹⁾²⁴⁾ あるいは protease inhibitor などの蛋白物質¹⁰⁾¹²⁾はSTに局在することが確められている。しかしながら、培養環境下でSTの機能形態像が保たれるのは、培養開始後2日間程度であり、これに対してCTでは少なくとも4日間は十分に機能形態像が保持されていた。われわれの in vitro の成績では、絨毛には培養後4日間はその組織構築を失うことなくHSD活性もPA suppressor 活性も証明された。これらのことから、in vitro の培養では、CTは機能細胞としての特性を発現しており、そのためSTが変性像を示すようになった後も、絨毛機能が維持されているのではないかと推測される。すなわち、培養3日以降では、CTは形態分化を行なうことなく機能分化している可能性が伺われる。hCG, α -subunit, β -subunit についても類似の報告がみられる¹⁰⁾¹²⁾。重症妊娠中毒症あるいは hypoxxygenation の際の胎盤には特徴的な所見としてCTの増生が観察される²⁰⁾。このことから絨毛は、in vivo でも非生理的な、たとえば hypoxic な環境下では、培養条件下でみられたように、形態分化を伴わないCTの機能分化という現象が起きている可能性が示唆される。

結 語

われわれが独自に開発した器官培養におけるヒト胎盤絨毛について、形態ならびに機能の面から逐日的に検討した。そして、絨毛の viability は、 [^{125}I]-IUdR を用いたDNA活性を指標とすると

4日間, PA suppressor 活性では5日間, そしてHSD活性では7日間維持されることがわかった。また, 組織学的には培養絨毛は少なくとも培養開始後4日間は, 組織構築の integrity がほぼ良好に保持されることがわかった。

本研究の御指導ならびに本論文の御校閲を頂きました坂元正一主任教授に深謝いたします。なお, 本論文の要旨の一部は, 第54回日本内分泌学会総会, 第55回日本内分泌学会秋季大会にて発表した。

文 献

- 1) Baillie, A.H., Cameron, E.H.D., Griffiths, K. and Hart, D.M.: 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the adrenal gland and placenta. *J. Endocrin.*, 31: 227–233, 1965.
- 2) Balls, M. and Monnickendam, M.A.: "Organ culture in biochemical research". Cambridge Univ. Press, Cambridge, England, 1976.
- 3) Bertha, L.L., Helen, W.D. and Seymour, L.R.: Enzymic histochemistry of the villous portion of the human placenta from six weeks of gestation to term. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 83: 295–299, 1962.
- 4) Bohn, H. and Wincker, W.: Isolierung und Charakterisierung des Plazenta-Protein PP 5. *Arch. Gynäk.*, 223: 179–186, 1977.
- 5) 陳 瑞東, 中林正雄, 小島俊行, 関 博之, 佐藤和雄, 坂元正一: Inducer of plasminogen activator (IPA) の測定法の開発。血液と脈管 (投稿中)
- 6) Chung, H.K., McLimans, W.F., Horoszewicz, J. and Hreschchyshyn, M.M.: In vitro studies of human trophoblast. *In vitro*, 104: 945–952, 1969.
- 7) Contractor, S. F., Banks, R.W., Jones, C.J.P. and Fox, H.: A possible role for placental lysosomes in the formation of villous syncytiotrophoblast. *Cell Tiss. Res.*, 178: 411–419, 1977.
- 8) Cotte, C., Easty, G.C., Neville, A.M. and Monaghan, P.: Preparation of highly purified cytotrophoblast from human placenta with subsequent modulation to form syncytiotrophoblast in monolayer culture. *In vitro*, 16: 639–646, 1980.
- 9) Drapier, J.C., Tenu, J.P., Lemaire, G. and Petit, J.F.: Regulation of plasminogen activator secretion in mouse peritoneal macrophage. *Biochemie*, 61: 463–471, 1978.
- 10) Fox, H. and Karkhonger, F.N.: Immunofluorescent localization of chorionic gonadotropin in the placenta and in tissue cultures of human trophoblast. *J. Path.*, 101: 277–282, 1970.
- 11) Franchimont, P., Reuter, A.M. and Gespard, U.: Ectopic production of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. In current topics in experimental endocrinology (Ed.) Matrin, L. and James, V.H.T., 3: 201–216. New York and London: Academic press, 1978.
- 12) Gespard, U.J., Hustin, J., Reuter, A.M., Labotte, R. and Franchimont, P.: Immunofluorescent localization of placental lactogen, chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits in organ culture of human placenta. *Placenta*, 1: 135–144, 1980.
- 13) Hall, C.St.G., James, T.E., Goodyer, C., Branchard, C., Guyda, H. and Giroud, C.J.P.: Short term tissue culture of human midterm and term placenta: Parameters of hormonogenesis. *Steroids*, 30: 569–580, 1977.
- 14) 橋本隆史: ヒト胎盤絨毛におけるSyncytiotrophoblastの形成機序に関する研究 autoradiographyならびに電子顕微鏡的研究。産婦進歩, 22: 435–448, 1970.
- 15) Huot, R.I., Froidart, J.M. and Stromberg, K.: Effects of culture conditions on the synthesis of human chorionic gonadotropin by placental organ culture. *In vitro*, 15: 497–502, 1979.
- 16) Hustin, J.

and Gespard, U.: Comparison of histological changes seen in placental tissue cultures and in placentae obtained after fetal death. *Brit. J. Obstet. Gynaec.*, 84: 210–215, 1977.

17) Giff, W.: Substrate and nucleotide specificity of placental microsomal 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids*, 37: 23–32, 1981.

18) Kinoshita, M., Tominaga, T. and Nishimura, T.: Observation of rapid migration of trophoblastic cells from human chorionic villi cultured of fixed gelatin film (in English). *Acta Obst. Gynaec. Jap.*, 23: 133–139, 1976.

19) Midgley, A.R.Jr., Piece, G.B.Jr., Deneau, G.A. and Gosling, J.R. G.: Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science*, 41: 349–350, 1963.

20) 荻野満春, 箕浦茂樹, 水野正彦, 坂元正一: 因子分析による定量的胎盤形態学と胎児予後. *臨婦産*, 35: 669–675, 1981.

21) 奥平吉雄, 鈴木俊作, 奥平美奈子, 橋本隆史, 早川謙一: Syncytiotrophoblast 形成に関する電子顕鏡的研究. *J. Elec. Microscopy*, 17: 47–54, 1968.

22) Stromberg, K., Azizkham, J.C. and Speeg, K.V.Jr.: Isolation of functional human trophoblast cells and their partial characterization in primary cell culture. *In vitro*, 14: 631–638, 1978.

23) Tao, T.W. and Hertig, A.T.: Viability and differentiation of human trophoblast in organ culture. *Am. J. Anat.*, 116: 315–328, 1969.

24) Trowell, O.A.: The culture of mature organ in a synthetic medium. *Exp. Cell Res.*, 16: 118–147, 1959.

25) Uszyński, M.: Anticoagulant activity of peptides from the human placenta. *Throm. Res.*, 16: 689–694, 1979.

(受付日: 58. 3. 25)