乳牛の黄体由来細胞の細胞培養と GTH 添加 による細胞数の比較

川 上 静 夫・大 地 隆 温

(麻布獣医科大学 家畜臨床繁殖学研究室)

近年、細胞培養法の著しい進歩により、*in vitro* で培養細胞を用いて詳細な研究ができるようになった。我々は、培養細胞を用いて現在、乳牛の性周期中にみられる卵胞の発育および黄体の退行に関する要因をしらべているが、前回報告¹⁾の卵胞内顆粒膜細胞の培養に続き、今回は黄体からの細胞を分離培養することができた。

この実験は、性腺刺激ホルモン（以下 GTH と略す）に対して培養細胞レベルにおける黄体由来細胞の反応が見られるかどうかについて、主に細胞の発育増殖等を中心に行ったものであり、併せて培養液中に分泌されたプロゲステロン、エストロジェンの定量も行ったのでその概要を報告する。

実験材料ならびに方法

1. 実験材料

a) 黄体由来細胞：屠殺直後のホルスタイン成雌牛 5 頭から採取したもので、いずれもほぼ開花期に近いとみなされる大きさの黄体から採取した。

b) 使用培地：イーグル MEM 培地 (EAGLE's minimum essential medium) にカナマイシンを約 0.6%，フェノールレッド 0.06% の割合に添加のものである。前もって蒸留水で所定の濃度に溶解後、滅菌して冷蔵庫に保存し、使用時、成雌牛血清 10%，結晶グルタミンを 0.029% の割合に添加し炭酸水素ナトリウムで pH 7.2 に修正した。

c) 供試 GTH: HCG (プベローゲン・三共ゾーキ)，PMS (セラルモン・東芝製薬)，Prolactin (プロラクチン・帝国臓器) を使用時、培養液に溶かして使用した。

2. 実験方法

当研究室では常時各系統の黄体由来細胞を継代培養し

ており、必要に応じこれらのうちから適当なものを選び供試している。従って、もとの黄体や供試時の代数等は必ずしも一致していない。また実験期間（培養期間）も細胞の発育の程度により多少のちがいがあがある。これらのものを用い GTH を添加し、増殖状態を比較した（表 1）。これら一連の培養術式、並びに GTH 添加の要領は次のとおりである。

a) 細胞の採取：ほぼ開花期大の黄体を使用し、CMF 溶液 (Tyrode solution から Ca と Mg を除いた溶液) 中で余分な組織を取り除き、黄体組織のできるだけ内部を採取し約 2~3 mm³ の大きさに細切した。細切後、肉眼でわかる程度の結合組織は、すべて取り除き 2~3 回洗浄後、組織の数倍量の 0.025% トリプシン溶液 (溶媒は CMF 溶液) を加え 95% O₂, 5% CO₂ 孵卵器内で 20 分間保存した。その後上清を捨て、細切した黄体組織片を容量 50 ml の三角コルベンに移し 0.25% トリプシン溶液 20 ml を加え、これに各 2~3 mg のコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼを加えウォーターバスで 36°C, 15 分間処理後マグネチックスターラーで 30 分間ゆるやかに攪拌し、得られた細胞浮遊液を 800 rpm で 5 分間遠沈した。次いで沈殿細胞に培養液の適当量を加えビベットでゆるやかに攪拌し、白血球計算板で細胞数を計算し 5 × 10⁶ ml 以上の濃度になるよう培養液 20 ml を入れた TD-40 培養瓶に移植し 36°C の孵卵器内に静置培養した。

b) 細胞の継代：初代培養は細胞移植後、細胞がほぼ培養瓶の底面全般に付着するのを待って新しい培養液ととり替え、付着した細胞が培養瓶の底面全般に発育増殖するのを待って継代を行った。

継代操作は、まず上清を取り除き、ついであらかじめ 36°C に保温してある 0.1% トリプシン溶液 10 ml を加え、36°C 孵卵器内に 15 分間静置すると細胞が底面からはがれてくるので軽くビベッティングし、はがれなかった細胞をはがし、再び 36°C の孵卵器内に 5~10 分間静置した後、静かにビベッティングして細胞を完全にはがした。この細胞浮遊液を 800 rpm で 5 分間遠沈し

Bovine luteal cell culture and its susceptibility to gonadotropin *in vitro*.

KAWAKAMI, Shizuo & Takaharu ŌCHI (Laboratory of Animal Reproduction, Azabu Veterinary College, Sagami-hara-shi, Kanagawa 229)

Jap. J. Animal Reprod. 22 (2), 1976.

表 1 黄体由来細胞に対する GTH 添加による細胞数の比較

黄 体 の 区 分	A	B	C	D	E	平均細胞数割合
供 試 時 代 数	3	10	13	2	3	
培 養 日 数	4		4	5	7	
実 験 番 号	①	②	③	④	⑤	⑥
対 照	1010 (100)	1132 (100)	784 (100)	490 (100)	310 (100)	437 (100)
HCG 1000 MU	1720 (170)		1650 (210)	1620 (330)		730 (167)
PMS 500 IU		820 (72)			172 (55)	323 (73)
Prolactin 100 IU					1445 (330)	1405 (330)
						425 (100)
						663 (156)
						295 (69)
						(100)
						(206)
						(67)
						(330)

注) 1. 数字は 20 ml 中の細胞数 ($\times 10^3$) を示し () 内は対照を 100% とした時の % を示す。

2. A, B, C, D, E はそれぞれ由来が異なる黄体を示す。

て、沈殿細胞に培養液の適当量を加え軽く攪拌し TD-40 培養瓶 2 本に継代した。

c) 細胞の観察および細胞数の算定: 倒立位相差生物顕微鏡で、培養瓶の底面に発育増殖した生材料を速やかに観察するとともに、培養瓶内にあらかじめ入っていたカバーガラスを適時とりだし、これに付着している細胞をギムザおよび HE 染色などを施して細胞の形態を観察した。

細胞の増殖状態を算定する時期は、同じ実験群の中でどれかが鏡検してほぼ培養瓶の底面全般に増殖したと見られる時期を選び上清のみを採取して凍結保存した。一方、培養瓶に付着した細胞に対しては 0.02% EDTA 溶液 9 ml に 1% トリプシン溶液 (EDTA 溶液, トリプシン溶液の溶媒はいずれも CMF 溶液使用) 1 ml を加え、36°C 孵卵器に 20~30 分間静置して細胞を底面からはがし、ピペッティングして細胞を個々に分離して得られた細胞浮遊液を 1200 rpm, 5 分間遠沈して上清を捨てて細胞を集めた。次いで 0.02% EDTA 溶液を 1 ml 加えてピペットで細胞を溶液内に均一に分散させた後 0.1% クリスタル紫を 0.1 M クエン酸溶液に溶かしたものを適当量加えて再び軽くピペッティングし白血球計算板で計算した。なお上記の操作で増殖した細胞が培養瓶の底面からはがれない場合、または、はがれた細胞が個々に分離できない場合は、新しい溶液ととりかえ細胞を完全に分離した。

d) GTH の添加および細胞移植: HCG は培養液 20 ml 当り 1000 MU, PMS は 500 IU, Prolactin は 100 IU を添加した。なお、これら各培地に対する移植細胞数は、培養液 20 ml に対し約 20~40 万を基準とした。

e) プロジェステロンおよびエストロジェンの定量:

ラジオイムノアッセイによる血漿中の該ホルモン定量法には種々^{2~9)}あるが今回は牧野の方法⁷⁾に準じて行った。

実験成績

1. 細胞の発育所見

黄体を構成する細胞の分離は、我々の用いた方法により比較的容易にでき *in vitro* で顆粒膜細胞と同様に長期にわたり培養できたが、長かった 1 例では培養期間は 11 カ月、継代数は 43 代 (回) で継代不可能となった (図 1, 2, 4, 5)。

分離細胞の中でも特に大きいと思われる細胞は、鏡検下において黄色を呈し、また継代した細胞の 4 代目あたりに至るまで鏡検下においてこのような所見が見られたが、以後、継代が進むにつれて識別困難となった。

細胞の増殖性は、今回の培養方法では、生材料を位相差倒立顕微鏡で鏡検した結果、黄体由来細胞は培養初代において増殖力が弱く、細胞が TD-40 培養瓶の底面全般に増殖するまでにかなりの日数を要し、以後継代が進むにつれて次第に増殖性は良好となったが、継代第 6 代細胞においては増殖力が衰え次代継代までに 26 日を要した。以後再び良好となり平均継代間隔は 8 日であった。*in vitro* において増殖した黄体由来細胞の形態は、顆粒膜細胞にくらべ統一でなかった (図 7, 8, 9)。また増殖した細胞の中には、空隙様部分を有しているものもかなりあり、このような所見は継代した 10 代細胞に至るまで観察された (図 3)。

一方、比較のためにしらべた顆粒膜細胞は、初代培養以来 1 年 9 カ月を経過しているが、なおも増殖を続けている。

表 2 Hela-S₃ 細胞に対する GTH 添加による細胞数の比較

培 養 日 数	3		4		5		平均細胞数割合	
対 照	3605 (100)	755 (100)	620 (100)	2275 (100)	1765 (100)	717 (100)	845 (100)	(100)
HCG 1000 MU	3905 (108)	368 (49)	548 (88)	2150 (95)	1685 (95)	1013 (141)	1053 (125)	(100)
PMS 500 IU	3750 (104)	665 (88)	695 (112)	2083 (92)	1635 (93)	837 (117)	920 (109)	(102)
Prolactin 100 IU	3630 (101)	780 (103)	1028 (166)	2125 (93)	1805 (102)	820 (114)	1030 (122)	(114)

注) 数字は 20 ml 中の細胞数 ($\times 10^3$) を示し () 内は対照を 100% とした時の%を示す。

表 3 継代第 3 代黄体由来細胞および顆粒膜細胞培養液中のプロジェステロンおよびエストロジェン量

		プロジェステロン (ng/ml)	エストロジェン (E ₁ , E ₂ , E ₃ Fraction) (pg/ml)
培 地 (対 照)		0	0
黄 体 由 来 細胞	培養液を軽く攪拌	20.0	
	遠 心 上 清	23.1	
顆 粒 膜 細胞	培養液を軽く攪拌	4.9	0
	遠 心 上 清	3.8	

表 4 継代第 10 代黄体由来細胞培養液中のプロジェステロンおよびエストロジェン量

		プロジェステロン (ng/ml)	エストロジェン (E ₁ , E ₂ , E ₃ Fraction) (pg/ml)
培 地 (対 照)		0.01	0
培 養 液 を 軽 く 攪 拌		2.9	0
	遠 心 上 清	2.78	0

2. 黄体由来細胞に対する GTH 添加の影響

HCG 1000 MU, PMS 500 IU, Prolactin 100 IU を添加し細胞数を算定した結果を表 1 に示した。HCG を添加した①③④⑥⑦の対照に対する百分率の平均は 206 であり、対照に比べて細胞数の増加が見られた。また PMS を添加した②⑤⑥⑦の対照に対する百分率の平均は 67 であり、対照に比べて細胞数が少ない傾向が認められた。また prolactin を添加した⑥⑦の対照に対する百分率の平均は 330 であり、HCG を添加したものより対照に比べて著しく細胞数の増加する傾向が認められた。なお増殖した各添加試験の黄体由来細胞の形態についても HCG を添加したものは、対照に比べて細長くなる傾向が認められた (図 6)。また細胞数算定時の直前の培養

液の pH は、各試験共通して prolactin 添加のもの、HCG 添加のもの、無添加のもの、PMS 添加のもの順に低く、明らかに差が認められた。更に対照試験として Hela-S₃ 細胞 (人子宮頸癌由来の株細胞) を用いて同様に GTH 添加試験を行った結果、細胞数には黄体由来細胞に見られるような顕著な差が認められなかった (表 2)。

3. 培養液中のプロジェステロンおよびエストロジェン量の測定

移植前のイーグル培養液中にはプロジェステロン、エストロジェンのいずれも検出されなかったが、黄体由来細胞の継代第 3 代細胞 (表 1 に示した HCG 1000 MU 添加に用いた継代第 10 代、第 13 代細胞と同じ黄体由

来細胞)の7日目の培養液中には、培養液を軽く攪拌しそのまま判定したものは(細胞は少し含まれている)20.0 ng/ml、培養液を 1000 rpm、15 分間遠沈した上清中には 23.1 ng/ml のプロジェステロンが検出された。同様操作で顆粒膜細胞培養液についてしらべたが、エストロジェンは検出されなかった(表3)。また黄体由来細胞の継代第 10 代細胞(表1に示した HCG 1000 MU 添加試験に用いた継代第 10 代細胞と同じ細胞)の7日目の培養液中のプロジェステロン、エストロジェン定量では、培養液を攪拌しそのまま測定したものは 2.9 ng/ml、培養液を 1000 rpm、5 分間遠沈した上清中には 2.78 ng/ml のプロジェステロンが検出されたが移植前のイーグル培養液中にも 0.01 ng/ml のプロジェステロンが検出された(表4)。

考 察

黄体由来細胞の *in vitro* での培養は SAYERS ら¹⁰⁾によってなされており GOSPODAROWICZ¹¹⁾は、更に分離方法を検討し、その初代培養細胞を用いて実験を試みている。その中で分離細胞の方が黄体をスライスしたのを用いるよりも LH に対してプロジェステロン分泌能が高いことを指摘している。

今回、我々の用いた細胞分離方法は、上記の報告など¹⁰⁻¹²⁾を参考にして行ったものであるが長期間にわたり増殖を維持することができた。黄体から分離した細胞の中には、黄体細胞のほかに黄体形成に関与している他の細胞も含まれており、また同系の細胞でも发育段階の異なったものが混在していると考えられる。従って本実験では、黄体由来細胞という表現を用いたが黄体由来細胞は、顆粒膜細胞とは増殖様式、形態などにおいて差が認められている。

黄体由来細胞が *in vitro* で増殖を続けられることからみて生体内で黄体細胞が退行するのは、細胞自身の寿命によるのではなく、主として退行を促す因子の作用によるものと思われる。

GTH 添加試験においても prolactin、HCG 添加により増殖が促進されると思われる結果を得たが、特に prolactin 添加により HCG を添加した以上の細胞の増加する傾向が認められたことは、生体での黄体形成や維持機構との関連において今後検討する必要があると認められた。また細胞の増殖速度および寿命延長に対する GTH の効果についても検討しなければならない。

なお対照試験として行った Hela-S₃ 細胞を用いての GTH 添加試験においては、添加した GTH によって細

胞数に顕著な差が見られなかった。

in vitro で継代培養し今回の試験に使用した黄体由来細胞は GTH に対して感受性の面で特異的な性質を有しているようである。

また prolactin 添加によって細胞の増殖にかなりの影響がみられたことは、牛においても黄体機能と該ホルモンとの間に、なんらかの関連性の存在が示唆された。さらにラジオイムノアッセイによる黄体由来細胞および比較のために行った顆粒膜細胞の継代第 3 代細胞の培養液中のプロジェステロン、エストロジェン検定結果において、培養前の培地(対照)中には両ホルモンは検出されなかったのに、黄体由来細胞培養液中には、末梢血中に存在する黄体期の最高量の数倍量のプロジェステロンが検出された。また継代第 10 代細胞培養液中にもプロジェステロンが検出されたことは、継代第 3 代細胞と同様な性質がなお維持されていたものと思われる。また顆粒膜細胞培養液中にもプロジェステロンが検出されたことは、卵胞期におけるプロジェステロン産生と関係があるかもしれない。

摘 要

1. 乳牛の黄体由来細胞は、顆粒膜細胞の培養と同条件下において長期間にわたり継代培養が可能である。
2. 移植前の黄体由来細胞は球状を呈しており、人工培養した場合は底面に附着して扁平となるが、遊離させた場合は短時間で球状となる。
3. 黄体由来細胞は prolactin や HCG を添加することにより増殖が促進され、特に prolactin には HCG 以上にその作用が認められた。
4. 黄体由来細胞培養液中に HCG を添加すると細胞形態が細長くなることが認められた。
5. ラジオイムノアッセイによる黄体由来細胞の継代第 3 代細胞の培養液中のプロジェステロンは、培養液を軽く攪拌して測定した場合には 20.0 ng/ml、遠沈上清中には 23.1 ng/ml が検出され、さらにこの細胞を継代した 10 代細胞培養液について同様に行ったところ、それぞれ 2.9 ng/ml、2.8 ng/ml が検出された。また、比較のために行った顆粒膜細胞の継代第 3 代細胞の培養液中にも、培養液を軽く攪拌して測定した場合には 4.9 ng/ml、培養液を遠沈した上清中には 3.8 ng/ml のプロジェステロンが検出されたが、エストロジェンはいずれの場合も検出されなかった。

稿を終るにあたり、ステロイドホルモンの定量に御協力をいただいた農林省家畜衛生試験場研究第 3 部 中

原達夫, 百目鬼郁男両先生および材料を提供していただいた神奈川県相模原市上溝屠場並びに厚木市厚木屠場の関係各位に心からお礼を申し上げます。

(1975. 11. 25 受付)

文 献

- 1) 川上(静)・大地(隆): 本誌, **20**, 149, 1975.
- 2) ABRAHAM, G. E.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 866, 1969.
- 3) ABRAHAM, G. E., R. SWERDLOFF, D. TULCHINSKY & W. D. ODELL: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **32**, 619, 1971.
- 4) FURUYAMA, S. & C. A. NUGENT: *Steroids*, **17**, 663, 1971.
- 5) SPIELER, J. M., R. L. WEBB, R. J. SالدARINI & J. A. COPPOLA: *Steroids*, **19**, 751, 1972.
- 6) de VILLA, G. O., K. ROBERTS, W. G. WIEST, G. MIKHAIL & G. FLICKINGER: *J. clin. Endocrinol. Metab.*, **35**, 458, 1972.
- 7) 牧野(拓): 日内分泌学誌, **49**, 629, 1973.
- 8) 牧野(拓): 臨床病理, **21**, 930, 1973.
- 9) 百目鬼(郁)・中原(達)・山内(亮)・牧野(拓): 本誌, **20**, 95, 1974.
- 10) SAYERS, G., R. PORTANOVA, R. J. BEALL: In Karorinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 3rd Symposium, 22, 1971.
- 11) GOSPODAROWICZ, D. & F. GOSPODAROWICZ: *Endocrinology*, **90**, 1427, 1972.
- 12) CHANNING, C. P. & F. LEDWITZ-RIGBY: *Physiology and Genetics of Reproduction, Part B*, 353, 1974.

PLATE

- 図 1 初代分離時の黄体細胞 (×300)
 図 2 初代において細胞塊より増殖した部分 (×300)
 図 3 細胞内に空隙を有する細胞 (×300)
 図 4 継代第 7 代時トリプシン処理した細胞 (×300)
 図 5 継代第 7 代細胞培養 3 日 (×300)

- 図 6 HCG 添加により細長くなった細胞 (×300)
 図 7 上皮性細胞の形態をした部分 (×300)
 図 8 線維芽性細胞の形態をした部分 (×300)
 図 9 顆粒状の形態をした部分 (×300)