乳牛の培養卵胞顆粒膜細胞及び黄体由来細胞に対する 性腺刺激ホルモン添加の影響

とくに細胞数の変化及びプロジェステロン産生について

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)

著者らは、先に乳牛の成熟卵胞由来の顆粒膜細胞（以下 GC と略）及びほぼ開花期に近いと見なされる黄体由来細胞（以下 LC と略）の培養法について検討し、ついで、LC の培養液中に性腺刺激ホルモン（GTH）を添加すると GTH の種類により細胞増殖率に差が認められ、特に prolactin 添加により最も増殖率の高いことを報告した^{1,2)}。

今回は、1) GC に対する GTH 添加による細胞増殖率を比較し、同時に、GC を採取したもとの卵胞の大きさにより GTH に対する感受性に差が認められるかどうか、2) 各 GTH ごとに添加濃度の差による細胞増殖率を GC 及び LC を用いて比較した後、各 GTH 間の両細胞に対する影響についても検討した。また 3) GC, LC とも、一部のものについてはプロジェステロンの産生量を測定した。これらの成績について報告する。

実験材料ならびに方法

実験材料

1. GC 及び LC: 相模原食肉センター及び厚木食肉センターで屠殺直後のホルスタイン成雌牛から採取した。

GC は採取卵胞にしたがって、小卵胞（直径 2~3 mm）、中卵胞（直径 4~6 mm）、大卵胞（直径 7~12 mm）及び卵胞嚢腫（直径約 30 mm）由来のものに区分し、LC はほぼ開花期に近いと見なされる黄体から採取した。

2. Hela-s3 細胞: 人子宮頸癌由来の株細胞を用いた。

Effects of gonadotropins on the bovine granulosa and luteal cells *in vitro*.—Cell development and progesterone secretion.

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

Japan. J. Anim. Reprod. 23(1), 1977.

3. 使用培地: イーグル MEM 培地 (EAGLE's minimum essential medium) 9.4 に対し、蒸留水 1000 の割合に溶解した。なお、このものは、抗生剤及び指示薬として、溶解後においてカナマイシン 0.006%, フェノールレッド 0.0006% の割合になるよう添加されたものであり、使用時、卵巣摘出成牛血清を 10%, 結晶グルタミンを 0.0292% の割合に順次添加し、10% 炭酸水素ナトリウムで pH 7.2 に修正したものをを用いた。

4. 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。

実験方法

1. 細胞の採取及び初代培養法: 既報^{1,2)}と同様である。ただし GC では、小卵胞由来のものは同一卵巣に存在しているものを合せて供試し、他は嚢腫を含めすべて同一卵胞由来のものであった。あらかじめ注射器内に CMF 溶液を 5~10 ml 吸引しておき、卵胞液と混合して採取した。これは、卵胞液だけを用いて細胞を採取すると遠沈前に細胞が凝塊になるからである。遠沈は 800~1000 rpm で 5~10 分間行った。

2. 細胞の継代、観察、細胞数の算定等は、既報²⁾と同様である。

3. GTH の添加及び細胞の供試時の代数: 各 GTH はそれぞれ単味添加とし、培養液 20 ml 中に HCG は 500, 1000, 2000, 3000 MU, PMS は 250, 500, 1000, 2000 IU, prolactin は 5, 25, 50, 100, 200 IU とし、無添加対照（以下 control と記す）と比較した。供試 GC, LC とも 3 ないし 4 代細胞を用いた。

なお、比較のために Hela-s3 細胞を用いて同様な試験を行った。使用した培養瓶は TD-40 である。また、細胞計数時における細胞浮遊液の遠沈上清は、すみやかに凍結保存してプロジェステロン定量用とした。

4. プロジェステロンの定量: 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準じた。

表 1 小卵胞由来顆粒膜細胞

No.	①	②	③	平均細胞数割合 ± S. D.
供試時代数	3	3	3	
HCG 1000 MU	413 (134)	585 (190)	482 (157)	160±22
PMS 500 IU	190 (61)	150 (48)	156 (50)	53± 5
Prolactin 100 IU	735 (239)	1450 (472)	1140 (371)	360±95

注; 1. ①②③の細胞は由来は同じ。

2. 細胞数の単位は $\times 10^3/20\text{ ml}$, () は control を 100 とした時の数値を示す (表 2~5 についても同様)。

表 2 中卵胞由来顆粒膜細胞

No.	①	②	平均細胞数割合 ± S. D.
供試時代数	3	3	
HCG 1000 MU	285 (164)	290 (167)	165±1
PMS 500 IU	100 (57)	100 (57)	57±0
Prolactin 100 IU	570 (329)	550 (317)	323±6

注; ①②の細胞は由来は同じ。

表 3 大卵胞由来顆粒膜細胞

No.	①	②	③	④	平均細胞数割合 ± S. D.
供試時代数	2	4	2	2	
HCG 1000 MU	1150 (139)	956 (117)	270 (150)	153 (288)	173±67
PMS 500 IU	650 (78)	60 (7)	86 (47)	細胞剝離せず 計算不能	44±29
Prolactin 100 IU		1315 (161)	606 (336)	272 (513)	336±143

注; ①②③④の細胞は由来は異なる。

表 4 卵胞嚢腫由来顆粒膜細胞

No.	①	②	平均細胞数割合 ± S. D.
供試時代数	3	3	
HCG 1000 MU	840 (202)	1030 (137)	169±32
PMS 500 IU	330 (79)	590 (78)	78±0
Prolactin 100 IU	1240 (298)	1465 (195)	246±51

注; ①②の細胞は由来は同じ。

実験成績

1. GC に対する GTH 添加による細胞増殖率の比較
小, 中, 大卵胞及び卵胞嚢腫由来 GC に HCG 1000 MU, PMS 500 IU, prolactin 100 IU, を添加した場合の細胞増殖率を control と比較して表 1, 2, 3 及び 4 に示した。

すなわち, GC も LC と同様, 各 GTH に反応するが, いずれの卵胞由来の GC も prolactin 100 IU, HCG 1000 MU, control, PMS 500 IU の順に, 細胞増殖率は高くなることが認められた。

また, 細胞計数直前の培養液の pH は, いずれの場合も上記の細胞増殖率の高い順に低かった。

2. プロジェステロンの定量

GC については control: 0.74 ng/ml, HCG 1000 MU: 0.50 ng/ml, PMS 500 IU: 0.41 ng/ml, prolactin 100 IU: 0.93 ng/ml, 黄体由来細胞については, control: 0.38 ng/ml, HCG 1000 MU: 6.00 ng/ml, PMS 500IU: 2.50 ng/ml, prolactin 100 IU: 12.0 ng/ml のプロジェステロンがそれぞれ検出された。

3. GTH 添加濃度の差による細胞増殖率の比較

大卵胞由来 GC, 開花期に近い黄体由来 LC 及び Hela s 3 細胞の培養液中にそれぞれ HCG 500, 1000, 2000, 3000 MU, PMS 250, 500, 1000, 2000 IU, prolactin 5, 25, 50, 100, 200 IU を添加し, 表 6 の結果を得た。なお, 表中の数字は control を 100 とした場合の各細胞数の比較割合である。

用いた添加濃度の範囲において, HCG は, GC に対して添加量を増すにつれて細胞増殖率は高くなり, LC もやや細胞増殖率は低い類似の所見が認められた。PMS は, GC に対してやや抑制的であり, control 及び Hela-s 3 細胞の場合より細胞増殖率は低かった。LC は, 1000

表 5 ラジオイムノアッセイによる顆粒膜及び黄体由来細胞の培養液中のプロジェステロン量 (ng/ml)

	顆粒膜細胞培養液*		黄体由来細胞培養液**	
	細胞数 (割合)	プロジェステロン量	細胞数 (割合)	プロジェステロン量
Control	173 (100)	0.74	437 (100)	6.38
HCG 1000 MU	285 (164)	0.50	730 (167)	6.00
PMS 500 IU	100 (58)	0.41	323 (73)	2.50
Prolactin 100 IU	570 (329)	0.93	1405 (330)	12.0

注; * 表 2 の①からの試料

** 既報²⁾の表 1 の⑥からの試料

表 6. HCG, PMS 及び Prolactin 添加による細胞増殖率の比較

区 分	顆粒膜細胞	黄体由来細胞	Hela-s3細胞
Control	100	100	100
HCG 500 MU	172	177	72
" 1000 MU	261	198	103
" 2000 MU	276	202	98
" 3000 MU	355	297	92
PMS 250 IU	73	115	94
" 500 IU	82	96	97
" 1000 IU	84	78	106
" 2000 IU	75	103	97
Prolactin 5 IU	100	100	100
" 25 IU	180	230	108
" 50 IU	254	303	105
" 100 IU	246	372	101
" 200 IU	160	381	91

注; 数値は, control を 100 とした場合の各細胞数の比較割合である。

IU 添加した時が細胞増殖率は最も低かった。prolactin は, GC に対して 50 IU 添加した時が細胞増殖率は最も高く, 100, 200 IU と次第に低くなった。LC に対しては, 添加量を増すにつれて細胞増殖率は高くなることが認められた。

なお, 比較のために用いた Hela-s3 細胞は, HCG, PMS, prolactin 添加において, いずれも control に比べ顕著な差は認められなかった。

また, 増殖した細胞の形態については, prolactin の添加濃度を増すにつれて, GC 及び LC に顕著な線維芽化が認められた (図 1~12)。

考 察

牛卵巣に対する prolactin の作用はほとんど解明されておらず, 黄体機能についての関与も HOFFMANN ら³⁾によると prolactin よりむしろ LH が黄体刺激因子であるといっており, この作用面での LH と prolactin の分担は判然としていない。

しかし, *in vitro* に関する限りでは, prolactin も GC 及び LC に対して刺激的な作用を及ぼすことが認められた。

つぎに, 今回の実験では, 大きさの異なる卵胞からの GC 間には GTH 添加に対する細胞増殖率には顕著な差は見られなかったが, CHANNING ら⁴⁾は *in vitro* の実験において, 豚の発情同期中の各時期の卵胞由来 GC 間には HCG に対する感受性に明らかな差のあることを報告している。しかし, 今回の実験は, 卵胞の大きさによる分類のため, 厳密な意味でのステージとはいいがたく, また細胞の増殖率と HCG に対する感受性とを比較することには無理があるので更に検討したい。

また, 既報で述べたとおり, GC からもプロジェステロン分泌が見られることは, 卵胞期におけるプロジェステロン産生との関係を裏付けていると思われる。

細胞増殖数とプロジェステロン量との関係については, 細胞 1 個あたりとしてみた場合は, 比例した値が得られなかったが, この点に関しては, 培養日数や細胞のホルモン産生時期などについてさらに検討する必要があると思われる。

摘 要

1. 乳牛の GC は, LC と同様に prolactin や HCG を添加することにより増殖が促進されたが, 今回の実験範囲内では prolactin 100 IU 及び HCG 1000 MU 以上

にその作用が認められた。

2. 大ききの異なる卵胞由来 GC 間には, GTH 添加に対する感受性には顕著な差は見られなかった。

3. GTH の各添加濃度の差による細胞増殖率の比較では, 用いた添加量の範囲において,

a) HCG は, GC に対して添加量を増すにつれて細胞増殖率は高くなり, LC も GC に比べてやや低いが類似の所見が認められた。

b) PMS は, GC に対してやや抑制的であり, control 及び比較のために用いた Hela-s3 細胞の場合より細胞増殖率は低かった。LC に対しては, 1000 IU 添加した時が最も細胞増殖率は低かった。

c) prolactin は, GC に対して 50 IU 添加した時が細胞増殖率は最も高く, 100, 200 IU と次第に低くなった。LC に対しては, 添加量を増すにつれて細胞増殖率は高くなることが認められた。

4. GC 及び LC は, 培養細胞のレベルにおいても GTH に対して特異的に反応することが認められた。

5. GC 及び LC は, prolactin の添加濃度を増すにつれて細胞形態が次第に線維芽化することが認められた(図 1~12)。

6. 中卵胞由来 GC の継代 3 代細胞の GTH 添加試験における培養液中のプロジェステロンは, control: 0.74 ng/ml, HCG 1000 IU: 0.50 ng/ml, PMS 500 IU: 0.41

ng/ml, prolactin 100 IU: 0.93 ng/ml がそれぞれ検出され, LC の継代 3 代細胞による同様の実験では, control: 6.38 ng/ml, HCG 1000 MU: 6.00 ng/ml, PMS 500 IU: 2.50 ng/ml, prolactin 100 IU: 12.0 ng/ml が検出された。

稿を終わるにあたり, 材料採取に御協力をいただいた神奈川県相模原食肉センター川戸欣之助所長, 相模原保健所木下義彦課長, 大和保健所宮崎勇吉係長ならびに関係各位に心から御礼を申し上げます。

(1976. 9. 22 受付)

文 献

- 1) 川上(静)・大地(隆): 本誌 20, 149, 1975.
- 2) 川上(静)・大地(隆): 本誌 22, 50, 1976.
- 3) HOFFMANN, B., D. SCHAMS, R. BOPP, M. L. ENDER, T. GIMENEZ & H. KARG: *J. Reprod. Fert.* 40, 77, 1974.
- 4) CHANNING, C. P. & LEDWITZ-RIGBY: In *Physiology and Genetics of Reproduction*, Part B, Eds. COUTINHO, E. M. & FUCHS, F., p. 353, Plenum, New York & London, 1974.
- 5) CHANNING, C. P. & S. KAMMERMAN: *Biol. Reprod.* 10, 179, 1974.
- 6) CHANNING, C. P.: *Endocrinology* 87, 49, 1970.
- 7) KAMMERMAN, S. & C. P. CHANNING: *J. Clin. Endocrinol. metab.* 38, 463, 1974.
- 8) 黒沢(忠), 日不妊会誌 17, 1, 1972.

PLATE

図 1 顆粒膜細胞 Control (×20)
 図 2 " (×50)
 図 3 " Prolactin 5 IU (×20)
 図 4 " Prolactin 50 IU (×20)
 図 5 " Prolactin 200 IU (×20)
 図 6 " " (×50)

図 7 黄体由来細胞, Control (×20)
 図 8 " (×50)
 図 9 " Prolactin 5 IU (×20)
 図 10 " Prolactin 50 IU (×20)
 図 11 " Prolactin 200 IU (×20)
 図 12 " " (×50)