一 研 究 一

乳牛の培養卵胞顆粒層細胞および黄体由来細胞に対する
性腺刺激ホルモン混合添加の影響

とくに細胞数の変化および progesterone 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、前回²⁾の報告で乳牛の卵巣から採取した直径 7~12 mm の卵胞由来顆粒層細胞 (granulosa cell, 以下 GC と略す) と、ほぼ開花期の大きさに近い黄体由来細胞 (luteal cell, 以下 LC と略す) および対照試験として HeLa-S3 細胞の培養液 20 ml 中に性腺刺激ホルモン (以下 GTH と略す) を単独添加し、添加濃度の差による細胞増殖率を比較した。それによると GC および LC は用いた添加濃度の範囲において、PMS では増殖が抑制され、逆に HCG および prolactin では増殖が促進される成績を得た。

今回は GC および LC の培養液中に、増殖抑制効果のあった PMS と、増殖促進効果のあった HCG あるいは prolactin を添加し、添加濃度ならびに両者の比率を変えて、細胞増殖に対する協力効果の有無を検討した。

また、培養を行った GC および LC とも一部のものについて progesterone の産生量を測定したので、これらの成績についてもあわせて報告する。

実験材料ならびに方法

実験材料

1. GC 及び LC: 屠殺直後のホルスタイン種成牛から卵巣を採取した。GC は直径 7~12 mm の卵胞由来のもの、LC はほぼ開花期の大きさに近い黄体由来のものであった。

2. 使用培地: 培養には、イーグル MEM 培地 (ニッ

Effect of combined addition of gonadotropins on the bovine granulosa and luteal cells *in vitro*.—Cell development and progesterone production.

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

Japan. J. Anim. Reprod. 24 (1), 1978.

サン製) に非働化したホルスタイン種去勢成牛血清を 10% の割合に添加したものをを用いた。

3. 供試 GHT: HCG (プベローゲン・三共ゾーキ), PMS (セラルモン・東芝製薬) 及び prolactin (プロラクチン・帝国臓器) を培養液に溶解して使用した。

実験方法

1. 細胞の採取、初代培養ならびに継代: 既報^{1,2)}の方法に準じて行った。

2. 細胞の発育状態の観察及び細胞数の算定: 倒立位相差生物顕微鏡を用い、培養瓶の底面に発育増殖した生材料を観察した。

細胞数を算定する時期は、同じ実験群の中で発育の早いどれかが、ほぼ培養瓶の底面全般に増殖した時点とし、全群同時に処理を行った。すなわち上清を採取した後、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 (Tyrode solution から Ca と Mg とを除いた溶液) を使用] 1 ml 加え 36°C の孵卵器に静置した。先に採取した上清は 1,200 rpm, 5 分間遠沈し、その上清は速やかに凍結保存し、沈渣は 36°C の孵卵器に静置してある培養瓶内に加えて 15~30 分後、細胞を底面から剝離し、ピペ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 1,200 rpm, 5 分間遠沈して上清を捨て細胞を集めた。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量加えて、再び軽くピペティングし、白血球計算板で速やかに計数した。なお上記の操作で、増殖した細胞が培養瓶の底面から剝離しない場合、または剝離し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させた。

Table 1. List of combined addition of PMS, HCG and prolactin on the bovine granulosa and luteal cells in culture

Group	PMS (IU)	HCG (MU)	PMS (IU)	Prolactin (IU)
A	500		500	
	500	10	500	5
	500	50	500	25
	500	100	500	50
		10		5
		50		25
		100		50
		100		50
B	10	100	10	50
	50	100	50	50
	100	100	100	50
	10		10	
	50		50	
	100		100	
Control	0	0	0	0

U/20 ml medium.

細胞の増殖率は、GTH 無添加培地における細胞増殖率を 100 (control) とし、これを基準にして添加群と比較した。

3. 細胞の供試時の継代数及び GTH の混合添加: 供試 GC 及び LC とも 3 代細胞を用いた。各 GTH の混合添加濃度については表 1 に示した。

すなわち、PMS と HCG の組合せでは、PMS 500 IU に HCG を 10, 50, 100 MU の割合に加えたもの (実験 I-A 区)、と HCG 100 MU に PMS を 10, 50, 100 IU の割合に加えたもの (実験 I-B 区)、また、PMS と prolactin の組合せでは、PMS 500 IU に prolactin を 5, 25, 50 IU の割合に加えたもの (実験 II-A 区) と、prolactin 50 IU に PMS を 10, 50, 100 IU の割合に加えたもの (実験 II-B 区) について行った。なお、各 GTH とも、上述の混合添加試験に用いた各濃度の単独溶液についても比較のため同時に試験した (表 1)。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 40 万を基準にした。使用した培養瓶は TD-40 であり、また細胞計数時における細胞浮遊液の遠沈上清は、速やかに凍結保存して progesterone 定量用とした。

4. progesterone 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^{3,4)}。

実験成績

1. 細胞増殖に及ぼす影響

1) 実験 I-A 区: PMS 500 IU と HCG 各 10, 50,

100 MU を組合せた場合

1-1) GC に対する影響: 増殖率は PMS 500 IU + HCG 10 MU 区から順に 110.7, 133.7, 159.6 であった。

また、PMS 500 IU 単独添加での増殖率は 85.1; HCG 10, 50, 100 MU 各単独ではそれぞれ 139.2, 176.8, 180.3 であった (表 2 の A)。

1-2) LC に対する影響: 増殖率は PMS 500 IU + HCG 10 MU 区から順に 128.4, 156.1, 195.0 であり、PMS 500 IU 単独添加では 94.2, HCG 10, 50, 100 MU 各単独では、それぞれ 217.9, 245.6, 228.3 であった (表 2 の A)。

2) 実験 I-B 区 HCG 100 MU と PMS 各 10, 50, 100 IU を組合せた場合

2-1) GC に対する影響: 増殖率は、HCG 100 MU + PMS 10 IU 区から順に 139.0, 142.1, 125.0 であり、HCG 100 MU 単独添加での増殖率は 140.6; PMS 10, 50, 100 IU 各単独では、それぞれ 85.1, 78.1, 67.1 であった (表 2 の B)。

2-2) LC に対する影響: 増殖率は、HCG 100 MU + PMS 10 IU 区から順に 180.3, 161.5, 104.3 であり、HCG 100 MU 単独添加では 176.1; PMS 10, 50, 100 IU 各単独では、それぞれ 116.2, 87.2, 75.2 であった (表 2 の B)。

3) 実験 II-A 区 PMS 500 IU と prolactin 各 5, 25, 50 IU を組合せた場合

3-1) GC に対する影響: 増殖率は、PMS 500 IU +

Table 2. Effect of combined addition of PMS and HCG on development of the bovine granulosa and luteal cells in culture

Group	GTH used		Cell development (%)*	
	PMS (IU)	HCG (MU)	GC	LC
A	500		85.1	94.2
	500	10	110.7	128.4
	500	50	133.7	156.1
	500	100	159.6	195.0
		10	139.2	217.9
		50	176.8	245.6
		100	180.3	228.3
B		100	140.6	176.1
	10	100	139.0	180.3
	50	100	142.1	161.5
	100	100	125.0	104.3
	10		85.1	116.2
	50		78.1	87.2
	100		67.1	75.2
Control	0	0	100	100

* Compared with non-added GTH control (as 100%).

Table 3. Effect of combined addition of PMS and prolactin on development of the bovine granulosa and luteal cells in culture

Group	GTH used		Cell development (%)*	
	PMS (IU)	Prolactin (IU)	GC	LC
A	500		42.0	37.6
	500	5	60.6	69.7
	500	25	66.6	56.8
	500	50	62.0	77.9
		5	156.0	146.7
		25	172.6	198.1
		50	171.3	207.3
B		50	198.7	413.9
	10	50	188.3	400.0
	50	50	96.1	298.7
	100	50	94.8	288.6
	10		98.0	82.2
	50		61.0	84.8
	100		51.2	67.0
Control	0	0	100	100

* Compared with non-added GTH control (as 100%).

prolactin 5 IU 区から順に 60.6, 66.6, 62.0 であり, PMS 500 IU 単独添加での増殖率は 42.0; prolactin 5, 25, 50 IU 各単独では, それぞれ 156.0, 172.6, 171.3 であった (表 3 の A)。

3-2) LC に対する影響: 増殖率は, PMS 500 IU + prolactin 5 IU 区から順に 69.7, 56.8, 77.9 であり, PMS 500 IU 単独添加では, 37.6; prolactin 5, 25, 50 IU 各単独では, それぞれ 146.7, 198.1, 207.3 であった (表

Table 4. Effect of HCG, PMS and prolactin on cell development and progesterone production of the granulosa and luteal cells in culture

GTH used			Granulosa cells		Luteal cells	
PMS (IU)	HCG (MU)	Prolactin (IU)	Cell development (%)*	Progesterone (ng/ml)**	Cell development (%)*	Progesterone (ng/ml)**
	100		140.6	4.26	176.1	0.2
50	100		142.1	2.46	161.5	1.81
		50	198.7	0.68	413.9	1.39
50		50	96.1	2.66	298.7	2.16

* Compared with non-added GTH control (as 100%).

** Used RIA.

3 の A)。

4) 実験 II-B 区 prolactin 50 IU と PMS 各 10, 50, 100 MU を組合せた場合

4-1) GC に対する影響: 増殖率は prolactin 50 IU + PMS 10 IU 区から順に 188.3, 96.1, 94.8 であり, prolactin 50 IU 単独添加での増殖率は 198.7; PMS 10, 50, 100 IU 各単独では, それぞれ 98.0, 61.0, 51.2 であった (表 3 の B)。

4-2) LC に対する影響: 増殖率は prolactin 50 IU + PMS 10 IU 区から順に 400.0, 298.7, 288.6 であり, 50 IU 単独添加では, 413.9; PMS 10, 50, 100 IU 各単独では, それぞれ 82.2, 84.8, 67.0 であった (表 3 の B)。

2. Progesterone 産生に及ぼす影響

表 2 の A に示した HCG 100 MU 区, B に示した HCG 100 MU + PMS 50 IU 区について培養液中の progesterone を定量した結果, GC 培養液では, それぞれ 4.26 ng/ml, 2.46 ng/ml; LC 培養液では, 0.2 ng/ml, 1.81 ng/ml であった (表 4)。

また, 表 3 の B に示した prolactin 50 IU 区, prolactin 50 IU + PMS 50 IU 区についても progesterone を定量した結果, GC 培養液では, それぞれ 0.68 ng/ml, 2.66 ng/ml; LC 培養液では, 1.39 ng/ml, 2.16 ng/ml であった (表 4)。

考 察

一般に, PMS には卵巣を发育させる作用のあることが臨床的にも知られているが, 著者らの *in vitro* の実験では卵巣由来 GC に対しては増殖抑制効果のあることが認められ, LC に対しても同様な効果が認められている。

また, *in vitro* においては, HCG, prolactin によっ

て両細胞とも増殖が促進され, 特に乳牛の卵巣に対しては, その作用が判然としていない prolactin⁵⁻⁷⁾に, HCG に劣らぬ効果が認められたことは前号²⁾でも報告した。

一方, これらの GTH 相互の協力作用については, *in vitro* では 1931 年 FEVOLD⁸⁾が, FSH によって予め刺激された卵巣でなければ, LH による发育促進は認められないことを実証して以来, 多くの報告⁹⁻¹³⁾がある。

今回 *in vitro* で GTH 相互の協力作用が認められるか否かについて, 細胞増殖率を指標にして実験を試みたが, 用いた添加濃度の範囲においては混合した GTH の協力作用は認められなかった。

しかし, progesterone 産生については細胞増殖率にみられるような PMS の抑制的影響は認められず, 1 例を除いてむしろ PMS と HCG あるいは prolactin との協力作用を示唆する結果が得られた。

摘 要

乳牛の卵巣由来 GC 及び黄体由来の LC を培養し, GTH (PMS+HCG, PMS+prolactin) の混合添加が, それら両細胞の发育に及ぼす影響を検討し次の結果を得た。

1. 本実験に用いた添加濃度の範囲において, 両細胞の細胞増殖率には混合添加した GTH 相互の協力作用は認められなかった。

2. 継代 3 代 GC の培養液中の progesterone 産生量は, HCG 100 MU 区 4.26 ng/ml, HCG 100 MU + PMS 50 IU 区 2.46 ng/ml, prolactin 50 IU 区 0.68 ng/ml, prolactin 50 IU + PMS 50 IU 区 2.66 ng/ml であった。

また, 継代 3 代 LC の培養液中の progesterone 産生量は, HCG 100 MU 区 0.2 ng/ml, HCG 100 MU + PMS 50 IU 区 1.81 ng/ml, prolactin 50 IU 区 1.39 ng/ml, prolactin 50 IU + PMS 50 IU 区 2.16 ng/ml であった。

稿を終わるにあたり、材料採取に御協力をいただいた
神奈川県食肉衛生検査所厚木出張所松本正弘所長、相模
原出張所川戸欣之助所長ならびに関係各位に心からお礼
を申し上げます。

(1977, 7. 4 受付)

文 献

- 1) 川上(静)・大地(隆): 本誌 **22**, 50, 1976.
- 2) 川上(静)・大地(隆): 本誌 **23**, 25, 1977.
- 3) 吉田(孝)・田根(培)・向井(久)・野田(正)・高木
(繁)・牧野(拓)・神戸川(明): ホルモンと臨床,
21, 979, 1973.
- 4) 牧野(拓): 日内分泌誌, **49**, 629, 1973.
- 5) HOFFMAN, B., D. SCHAMS, R. BOPP, M. L.

- ENDER, T. GIMENEZ & H. KARG: *J. Reprod. Fert.* **40**, 77, 1974.
- 6) BARTOSIK, D., E. B. ROMANOFF, D. J. WATSON & E. SCRICO: *Endocrinology* **81**, 186, 1967.
 - 7) HANSEL, W. & R. B. SNOOK: *J. Dairy Sci.* **53**, 945, 1970.
 - 8) FEVOLD, H. L., F. L. HISAW & S. L. LEONARD: *Amer. J. Physiol.* **97**, 291, 1937.
 - 9) FOSTER, M. A., R. C. FOSTER & F. L. HISAW: *Endocrinology* **21**, 249, 1937.
 - 10) FRAENKEL-CONRAT, H., C. H. LI, M. E. SIMPSON & H. M. EVANS: *Endocrinology* **27**, 793, 1940.
 - 11) GREEP, R. O., H. B. VANDYKE & B. F. CHOW: *Endocrinology* **30**, 635, 1942.
 - 12) 今道(友)・江藤(禎): 本誌 **5**, 147, 1960.
 - 13) 笹本(修): 東農工大農学報 (13), 1970.