

細胞培養法による牛卵巢機能の検討

—とくに性腺刺激ホルモン・プロスタグランジン $F_{2\alpha}$

等に対する顆粒層細胞及び黄体由来細胞の反応について—

川 上 静 夫

A Study on Bovine Ovarian Function by Cell Culture
- With Special Reference to Response of Granulosa Cells
and Luteal Cells to Gonadotropin and Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -

Shizuo Kawakami
Department of Veterinary Medicine
Azabu University

Abstract

Cell culture initiated in 1907 by Harrison's nerve fiber culture has achieved so tremendous a progress as to enable detailed in vitro studies using cultured cells.

In this study, culture of granulosa cells (GC) and luteal cells (LC) from a cow ovary was undertaken to investigate the in vitro behavior of these cells free from the biological control mechanism which is presumed to regulate their behavior in vivo to a certain extent under the control of cerebroneural system, and also their behavior in the presence of gonadotropin (GTH) and prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). The behavioral aspects mainly studied were the multiplication and morphological characteristics of these cells together with secretion of progesterone and estrogen into the culture fluid.

Materials and Methods

GC was collected from the follicles of slaughtered animals and from those of live animals of the estrous stage using an injector. LC of the almost functional luteal stage was collected from slaughtered animals. For both the cells, subculture and primary culture cells were used in the experiment. Used in addition were slices of the corpus luteum.

The culture medium used was an Eagle MEM (Nissui) (1). After dissolution of this medium to a desired concentration,

10% cow and newborn calf sera were added. Culture was carried out by stationary incubation at 37°C.

GTH consisted of human chorionic gonadotropin (HCG), pregnant mare serum gonadotropin (PMS), prolactin, follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). They were added to the medium at the commencement of culture. The cell multiplication was determined when the cell growth was microscopically found to be spread over the entire bottom of the culture vessel. The supernatant was freeze-preserved for quantification of hormones. The cells adhered to the culture vessel were counted after the required treatment.

The cells grown on the bottom of the culture vessel was immediately examined using an inverted phase-contrast microscope. Furthermore, the cells adhered onto the cover glass placed in the culture vessel were, when necessary, stained by Giemsa or May-Gruenwald Giemsa to examine the cell morphology.

Results

1. Cell culture of GC and LC

Multiplication and morphology: GC and LC achieved smooth multiplication in vitro. The cells grown showed an epithelium-like morphology and indicated a possibility of subculture.

Hormone production: Hormone production in the culture fluid seemed to be most affected by the ovarian cycle at the time

of cell collection.

In culture of GC from animals of the estrous stage, the maximum productins of estradiol (E_2) and progesterone were considerably high, indicating significant differences compared to culture of GC from slaughtered animals. High production of progesterone suggested a functional shift of GC into LC.

In culture of LC, estrogen production was barely detected. Although progesterone production was large, remarkable variations such as seen in GC were not found.

2. Response of GTH to GC and LC

Single mixture of hormones: HCG, PMS, prolactin, FSH or LH generally accelerated multiplication of GC and LC. Especially prolactin demonstrated a higher accelerative effect than HCG. However, PMS had obviously an inhibitory action on multiplication of GC and LC.

No demonstrable results were obtained in relation to hormone production.

Combined mixture of hormones: Within the concentrations used in this experiment, no synergic effect was demonstrated on multiplication of GC and LC. No distinct results were also obtained on hormone production.

3. Response of $PGF_{2\alpha}$ to GC and LC

Cell multiplication: $PGF_{2\alpha}$ seemed to somewhat inhibit multiplication of GC and stimulate that of LC.

Hormone production: Progesterone production was markedly

accelerated in GC from slaughtered animals. However, no specific tendency in hormone production could be defined in GC from the follicles of animals at their estrous stage. Estrogen production seemed to be slightly accelerated in 5 of 8 culture vessels of GC from animals of the estrous stage.

Progesterone production tended to increase in LC. Estrogen production showed no distinct tendency. Almost the identical results were obtained in the experiment of the sliced corpus luteum.

The above findings confirmed that the phenomena occurring in vitro do not necessarily correspond with biological reactions occurring in vivo and suggested that the sexual function is governed in vivo by a complexity of factors. Thus the experiment with the cultured cells of follicular granulose cells and luteal cells seemed to be a helpful technique that allows simple analysis of the reproductive phenomena occurring in vivo under complicated control mechanisms.

「細胞培養法による牛卵巢機能の
検討」——とくに性腺刺激ホル
モン、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$
等に対する顆粒層細胞及び黄体
由来細胞の反応について——

川 上 静 夫

目 録

緒 言	1
オ 1 章 顆粒層細胞及び黄体由来細胞の細胞培養	5
オ 1 節 実験材料及び方法	7
実験材料	7
1) 顆粒層細胞	7
2) 黄体由来細胞	7
3) 使用培地	7
実験方法	8
1) 細胞の採取及び継代	8
2) 細胞の観察	11
3) エストロジェン, プロジェステロンの定量	11
オ 2 節 実験成績	13
1) 細胞の発育所見	13
2) エストロジェン, プロジェ	17

ステロン產生
オ 3 節 考察

18

オ 2 章 顆粒層細胞及び黄体由来細胞に対する性腺刺激ホルモンの添加の影響

64

オ 1 節 実験材料及び方法

65

実験材料

65

1) 顆粒層細胞及び黄体由来細胞

65

2) Hela-S3細胞

65

3) 供試性腺刺激ホルモン

65

4) 使用培地

66

実験方法

66

1) 細胞の採取及び初代培養法

66

2) 細胞の継代, 観察及び細胞数の算定

67

3) 性腺刺激ホルモンの添加

68

a)	HCG, PMS, Prolactin の各 単独及び混合添加	68
b)	FSH, LH 単独添加	70
4)	エストロジェン, プロジェ ステロンの定量	70
オ 2 節	実験成績	72
1)	HCG 1000 MU, PMS 500 IU, Prolactin 100 IU 単独添加	72
a)	細胞増殖に及ぼす影響	72
b)	プロジェステロン産生に 及ぼす影響	74
2)	HCG, PMS, Prolactin の単独 添加濃度差の細胞増殖に及 ぼす影響	74
3)	HCG, PMS, Prolactin の混合 添加の影響	76
a)	細胞増殖に及ぼす影響	76
b)	プロジェステロン産生に 及ぼす影響	79
4)	FSH, LH の単味添加濃度に	79

よる影響

a) 細胞増殖に及ぼす影響 79

ハ) エストロジェン, プロジ
エステロン産生に及ぼす
影響 81

オ 3 節 考察 85

オ 3 章 顆粒層細胞及び黄体由来細胞
に対する Prostaglandin $F_{2\alpha}$
添加の影響 179

オ 1 節 実験材料及び方法 177

実験材料 177

1) 使用培養細胞 177

2) 供試 Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 178

3) 使用培地 178

実験方法 179

1) 細胞の採取及び初代培養法 179

2) 供試細胞, 細胞数の算定時 181

期及び方法

- 3) 培養上澄液採取 182
- 4) 細胞の観察 183
- 5) Prostaglandin $F_{2\alpha}$ の添加 183
- 6) エストロジェン, プロジェステロンの定量 183

オス節 実験成績 184

- 1) 屠場材料の顆粒層細胞, 黄体由来細胞の継代3代細胞に対する影響 184
 - a) 細胞増殖 184
 - b) エストロジェン, プロジェステロン産生 184
- 2) 屠場材料の黄体由来細胞の初代細胞及び黄体のスライス片のプロジェステロン産生に及ぼす影響 185
- 3) 発情期の成熟卵胞由来顆粒層細胞のエストロジェン, プロジェステロン産生に及 186

第3章 考察
その影響

194

第4章 総括並に結論

209

謝辞

215

引用文献

216

緒言

1907年 Harrison の神経線維の培養に始まる発展的段階を迎え、次いで Carrel (1/3) の鶏胚結合織の培養で細胞培養は技術的に飛躍的進歩を遂げ、今日ではクローン化された細胞を使用して遺伝学や発生生物学、細胞生物学などの基礎的な学問分野だけでなく、医学、農学など広くライフサイエンスの各分野で欠くことのできないものとなっている。また、細胞融合の技法を利用してハイブリドーマの形成やモノクローナル抗体の産生、インターフェロンや各種ホルモンの量産など細胞工学的手法を用いた種々の実用面への利用もめざましい。

獣医学領域でも、このような観測からの研究がなされつつあるが、繁殖面においては比較的少ない。我々は、このような技法を牛の繁殖に関する基礎的領域において応用

することを立案し、卵巢における卵胞、黄体等を形成している細胞を対象とした実験を行った。その理由の一つとして、我が国における雌牛の泌尿生殖器病の占める割合は、全疾病数の半分以上を占めており、そのうち卵巢疾患の多いことが従来から認められている（深田、'55；老田、'63；袋地、'81；中原、'81；江渡、'81）。

卵巢疾患の中でも、卵巢機能減退と卵胞嚢腫が多く、これらのものは、卵巢機能が低下もしくは失調をきたしており、卵胞の発育、成熟、排卵、黄体の形成及びその維持、退行などが正常に営まれないもの、ひいてはホルモンの生合成、分泌などが順調に行われないために発情が正常に起こらないものなどを含んでいる。

牛の卵巢疾患に対しては、臨床的には種々な治療法がなされているが、主としてホルモン治療が行われており、人胎盤性性腺刺激ホルモン（HCG）、妊馬血清性性腺刺

激ホルモン (PMS) など、由来のちかうゴナドトロピン (GTH) 製剤が広く使用されており、それぞれの効果は認められているが、メカニズムについては詳細には検討されていない面も残っている。

また、疾病でなくとも *in vivo* での繁殖面における諸現象、とくに卵巣を中心とする現象、例えば黄体の形成やその発育の限界 (無限に大きくなる訳ではない)、また、卵胞においても、その発育に伴い顆粒層細胞 (Granulosa Cell = GC) が無限に増加せず、卵胞の動きに併行して増殖は停止する。このような自然の成り行きに関しては、当然のこととして、あまり疑問も持たれず経過し、それはいくらか究明されているとはいえないのが現状である。とくに発育が停止するメカニズムに関しては、なおさらその感が強い。

卵胞細胞の動き (その増殖、退行、機能など) についても、これまでは臓器の摘出

や外因性のホルモン投与による形態的ならびに組織像を中心とする変化、血清中のホルモン量の増減などから間接的にとらえられたものであり、生きた細胞を用いての検討はあまりなされていない。これらのことに鑑み、著者は、細胞培養技術の応用を試みた。

本研究は、乳牛の卵巣からのGC及び黄体由来細胞(Luteal Cell = LC)の細胞培養を試み、生体内では上位からの支配を受けて、ある程度その動きが規制されていると考えられているこれら両細胞を生体外にとりだし、フリーの状態にした場合、どのような生理的動態を示すのか、また、HCG、PMS等の他に卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、黄体刺激ホルモン(Prolactin)やプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$)とGC、LCとの相互の対応等を知る目的で行った基礎的実験である。

オ 1 章

顆粒層細胞及び黄体由来細胞の細胞培養

成牛の卵巣には、いろいろな发育過程の卵胞が多数存在しており、普通、発情時以外はそれほど著明な動きはみられないが、発情時には特定のものが急速に发育し、内卵胞膜細胞や顆粒層細胞（以下GCと略）などの发育増殖がみられる。また、黄体の形成は、GC及び内卵胞膜細胞に由来するといわれており、このような変化は、一応性腺刺激ホルモンの影響によるものと解され、統御された形で運営されている。

この章では、GC及び黄体由来細胞（以下LCと略）の細胞培養を試み、これら両細胞を生体外にとりだしフリーの状態にした場合、どのような生理的動態を示すかを知る目的で行ったものであり、主な観察点とし

ては、細胞の増殖状況や形態などの所見、
ならびにエストロジェン、プロジェステロ
ン分泌状況について検討を行った。

オ 1 節 実験材料及び方法

実験材料

1) GC

屠殺直後のホルスタイン成雌牛の同一卵巢に存在していた直径 $7 \sim 12 \text{ mm}$ の卵胞ここから採取したものを混合して供試した。

2) LC

屠殺直後のホルスタイン成雌牛のほぼ開花期に近いとみなされる大きさの黄体ここから採取した。

3) 使用培地

イーグル MEM 培地「ニッスイ」①を蒸留水で所定の濃度に溶解して、 121°C で15分間高圧滅菌後、冷蔵庫に保存のものに、使用時、L-グルタミンを 0.0292% 、非動化した成雌牛血清を 10% の割合に添加して、 10% 炭酸水素ナトリウム溶液で pH 7.2 に修正したものを用いた。

実験方法

1) 細胞の採取及び継代

採取した卵巣は、CMF 溶液 (Tyrode solution から Ca と Mg とを除いた溶液, Ca, Mg Free の略) 中に浸して保存した。

GC 採取は、注射器を卵胞内に刺し入れ、卵胞液の吸引と噴出を数回くり返した後、吸引した卵胞液を 800 ~ 1000 rpm, 5 分間遠沈して上澄液を分離後、前記イーグル培養液の適当量を加え、ピペットで緩徐に攪拌し、沈澱細胞をできるだけ個々に遊離させた。この細胞を約 $3 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/ml の濃度になるよう培地 20 ml を容れた TD-40 培養瓶に移植し、37°C で 2 日間静置培養すると細胞が底面全体に発育増殖するのをまって継代した。

LC は、CMF 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 $2 \sim 3 \text{ mm}^3$ 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回洗淨後、0.25% トリプシン溶液（溶媒は、CMF溶液）を組織の数倍量加え、37℃、95% 空気と5% CO₂ のガス相よりなる炭酸ガス培養器内で20分間感作した。その後、上澄液を捨て、細切した黄体組織片を容量50mlの三角コルベに移し、0.25% トリプシン溶液20mlを加え、これに300IUのコラゲナーゼ、400IUのヒアルロニダーゼを加え、ウォーターバスで37℃、15分間感作後、マグネチックスターラーで30分間ゆるやかに攪拌し、えられた細胞浮遊液を800rpmで5分間遠沈し、上澄液を吸引除去した。次いで沈澱細胞には、培養液を適量加え、ピペットでゆるやかに攪拌し、培養液20mlをいれたTD-40型培養瓶1~2本に移植し、37℃の孵卵器内で静置培養した。

一方、吸引した遠沈上澄液は、細胞数をさらにふやす必要のある場合に備えて、捨てずに黄体組織片が残っているものの容量50mlの三角コルベにもどした。必要に応

じて再びマグネチックスターラーで30分間、ゆるやかに攪拌し、えられた細胞浮遊液を前記同様に処理した。この処理をくり返すことにより必要とする細胞数を確保した。

細胞移植後、全細胞がほぼ培養瓶の底面に付着するのをまって新しい培養液ととり替^かえ、付着した細胞が培養瓶の底面全般に発育増殖するのをまって継代を行った。

継代操作は、まず上澄液を取り除き、ついであらかじめ37℃に保温した0.25%トリプシン溶液10mlを加え、37℃の孵卵器内に5~15分間静置すると、細胞が底面から剥離してくるので軽くピペッティングし、底面から離脱しかかった細胞を剥離し、再び37℃の孵卵器内に5~15分間静置した後、静かにピペッティングして細胞を完全に剥離した。この細胞浮遊液を800~1000rpm、5分間遠沈して、沈殿細胞に新しい培養液の適当量を加え軽く攪拌し、TD-40型培養瓶2本に継代した。

なお、遠沈時の上澄培養液は、エストロジェン、プロジェステロン定量用として凍結保存した。

2) 細胞の観察

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、培養瓶内にあるかじめ入れているカバーグラスを適宜とりだし、これに付着している細胞をギムザ及びメイ・グリュンワルドギムザ染色などを施して細胞の形態を観察した。また、ときどき染色体標本を常法により作製し、細胞分裂の状況を確認した。

3) エストロジェン、プロジェステロンの定量

Radioimmunoassay 法 (RIA 法) により、牧野氏らの方法 (牧野, '73; 牧野ら, '73) に準じて行った。ただし、GC 採取卵胞の卵胞

液中のエストロジエンは, Sulmanの血漿中のエストロジエン抽出法 (Sulman, '52) に準いて行い, 粗抽出物をゴマ油に溶解後, 去勢マウス腔内注入法で測定し, エストロンを用いて同様実施した価に換算した。

オ 2 節 実験成績

1) 細胞の発育所見

a) GC; 単層培養による乳牛のGC培養は、比較的容易であった。卵胞から採取し、培地へ移植前のGCは、球状で液中に浮遊している(図-1)。この細胞を培地に移植すると次オに沈澱し、オ1日目では、底面に付着し、次オに扁平状となり(図-2)、オ2日目には、さらに細胞質の部分か拡がるのか観察され(図-3)、オ5日目には、底面全般に増殖し、増殖の旺盛なところには重層がみられた(図-4)。これらは、卵胞からの培養経過を示したものであるか、継代を重ねたものをつぎに移植した場合でも、ほぼ同じ所見が認められた。

継代培養中の細胞が、分裂増殖していることを確かめるために、継代10代目のものの染色体を常法に従い検査したところ、分裂増殖像が認められた(図-5)。生材料を顕

微鏡で検査した結果、増殖性は、3代、4代、5代細胞あたりが良好で、7代細胞あたりでは、細胞形態が、やや菲薄となり、これらの変化にともない増殖力も幾分、弱くなる傾向が認められた。しかし、以後、再び増殖力は良好となり、11~12ヵ月にわたり継代できた。

G.C.の形態は、いわゆる上皮細胞様の形態を示し、7代細胞あたりから形態は、全般的に大きさを増し、生培養材料の鏡板による細胞観察で輪郭がやや不明瞭となった。なお、卵胞中のG.C.は、球状であるが、培養した場合は、他器官の培養細胞と同様に扁平となり、底面に付着するか遊離させた場合は、短時間で球状となった(図-6)。底面に付着している細胞をそのままアルコール固定し、ギムザ染色を行ったが、細胞の輪郭は、若干異なるが、各細胞とも被染性は均一で、核も明瞭で異質とみられる細胞は、発見できなかった。

なお、著者の培養したGCの中には、初代培養以来、現在まで9年10カ月を経過し、株細胞となつて旺盛な増殖を続けている細胞もある。このGCの株細胞は、日本株細胞登録委員会で承認され、登録番号JTC-35として登録されている（図-7, 8, 9, 10, 11, 12）。

㊦) LC；黄体を構成する細胞の分離は、著者の用いた方法により比較的容易にでき、GCと同様に11~12カ月にわたり継代培養できた（図-13, 14, 15, 16）。

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、生材料を倒立位相差生物顕微鏡で鏡検した結果、LCは、培養初代

において増殖力弱く，細胞がT_D-40培養瓶の底面全般に増殖するまでに30日を要し，以後，継代が進むにつれて増殖性は，次第に良好となったが継代6代細胞においては，増殖力が衰え，次第継代までに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LCの形態は，GCにくらべ有一でなかった（図-17, 18, 19）。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-20, 21, 22, 23）。

GC, LCの継代3代細胞の培地に対する移植細胞数と細胞増殖度の関係は，培地20 mlに対して約40万，培地5 mlに対して約10万移植すると，ほぼ7~10日間で培養瓶の底面全般に増殖することが確認された（図-24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36）。

2) エストロジェン, プロジェステロン産生

移植前の培養液中には, エストロジェン, プロジェステロンのいずれも検出されなかったが, LCの継代3代細胞の7日目の培養液を1000rpm, 15分間遠沈した上澄液中には23.1 ng/ml のプロジェステロンが検出された。同様操作でGCの培養液では3.8 ng/ml のプロジェステロンが検出されたが, エストロジェンは検出されなかった(表1)。

また, LCの継代10代細胞の7日目の培養液中のエストロジェン, プロジェステロン定量では, エストロジェンは検出されなかったがプロジェステロンは, 2.78 ng/ml が検出された(表2)。

オ 3 節 考 察

乳牛の卵胞から注射器で卵胞液を無菌的に吸引し、純粹にGCを採取し、培養することからできた。*in vitro*でのGCの増殖性は、11~12カ月の長期にわたり持続され、この長期持続したものは継代不能となったが、少なくとも生体内では、それほど活発な増殖をしているとは考えられない卵胞中の増殖性にくらべ、かなり旺盛と考えられる所見がみられた。

すなわち、生体内では、卵胞を形成しているGCや周辺組織の動きは、性腺刺激ホルモン²の支配に影響されており、とくにその発育増殖については明らかであるが、積極的な抑制という面は、それほど明確にはわかっていない。

他の器官細胞においても、このような現象は多くみられることは周知のことであるが、生体支配から解放された *in vitro* で、

GC が増殖することから, *in vivo* で増殖を抑制されている機序などについて *in vitro* レベルで今後, 追求する必要が認められた。

牛 LC の細胞培養について Sayers ら ('71) は, トリプシン処理により細胞を分離し, その初代 LC の培養液中に LH または HCG を添加して, 2 時間, 静置培養した結果, プロジェステロンの産生を助長したと報告している。次いで Gospodarowicz ら ('72) は, コラゲナーゼ-ヒアルロニダーゼで処理後, トリプシン-DNAse で処理する, いわゆる *two-step* の酵素処理法により細胞を分離し, その初代細胞の培養液中に LH を添加して, 4 時間, シェーカーで攪拌した結果, プロジェステロンの産生増加を認めたと報告している。さらに, Gospodarowicz ('71) は, 14 mg の黄体組織のスライス片を上記の *two-step* 酵素処理法により, 細胞を個々に分離したものと, 酵素処理をしない 14 mg のスライス片を LH を添加して, 2 時間 30

分、培養した結果、プロジェステロン産生は、黄体組織をスライスしたものより、分離細胞を用いる方がLHに対してかなり敏感であったと報告している。

本実験で用いた細胞分離方法は、上記の Sayers ら ('71) や Gaspodarowicz ら ('71, '72) の方法及び黒田 ('74) の「動物組織培養法」から動物組織の初代培養法などを参考にして考えられた方法であるが、この方法によって得られたLCは、GCと同様に11~12カ月の長期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、同系の細胞でも発育段階の異なったものが混在していると考えられるので、本実験では、黄体由来細胞(LC)という表現を用いたが、LCは、GCにくらべて培養初代では増殖力が弱く、培養瓶の底面全般に増殖するまでに30日を要

したり、形態も GC にくらべて斉一でなく、LCの中には、継代10代細胞に至るまで空隙様部分を有しているものかなりある等、増殖様式、形態などにおいて差が認められた。

LCが *in vitro* で増殖を続けられることから、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、それらを知る為の手段として、これらの手法は有効と考えられる。

次に、GC及びLCの継代3代細胞の培養液中のエストロジェン、プロジェステロンのRIA法による検定結果において、培養前の培地中（対照）には、両ホルモンは検出されなかったのに、LC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3代細胞と同

様な機能がなお維持されていたものと思われる。また、GC培養液中にもプロジェステロンが検出されたことは、排卵前の卵胞から一過性に分泌されるプロジェステロン産生と関係があるかもわからない。

Channing ('66, '70) は、月経周期12~14日目の赤毛猿、及び馬の発情期の卵巢から採取したGCを *in vitro* で培養し、その培養液中からプロジェステロンを検出している。我が国でも、東條('78)が、人の卵胞期大卵胞よりGCを採取して、単層培養を行い、プロジェステロンを分泌することを認め、また、プロジェステロン分泌は、黄体細胞様形態を呈する以前より始まっていると報告している。

また、培養GCのエストロジェン産生についても Channing ('69) は、人、馬のいろいろな時期の卵胞から、また、Ryanら('65) は、馬の発情期の卵胞からGCを採取して、単層培養し、その培養液中からエストロジ

エンを検出している。今回の実験では、GC培養液中には、エストロジエンは検出できなかったがGC採取卵胞の卵胞液中のエストロジエンをSalman法(152)に準いて定量した結果、検出できたので、培養GCのエストロジエン分泌の有無についても、さらに条件や方法を変え、検討する必要があると考えられたが、おそらく、RIA法などの微量検定法を用いれば定量できたのではないかと思われる。

Table 1. Estrogen and progesterone production of
the granulosa and luteal cells of tertiary
culture generation

	Progesterone ng/ml	Estrogen(E1,E2,E3 fraction) pg/ml
Medium(control)	ND	ND
Granulosa cells	3.8	ND
Luteal cells	23.1	

Note: Values were determined by RIA, after
7-days culture.

ND, not detected.

Table 2. Estrogen and progesterone production of
the luteal cells of tenth culture generation

	Progesterone ng/ml	Estrogen(E1,E2,E3 fraction) pg/ml
Medium(control)	ND	ND
Luteal cells	2.78	ND

Note: Values were determined by RIA, after
7-days culture.
ND, not detected.

Fig. 1. Granulosa cell suspension in the bovine follicular fluid. $\times 150$.

Fig. 2. One-day culture of bovine granulosa cells in primary culture. $\times 60$.

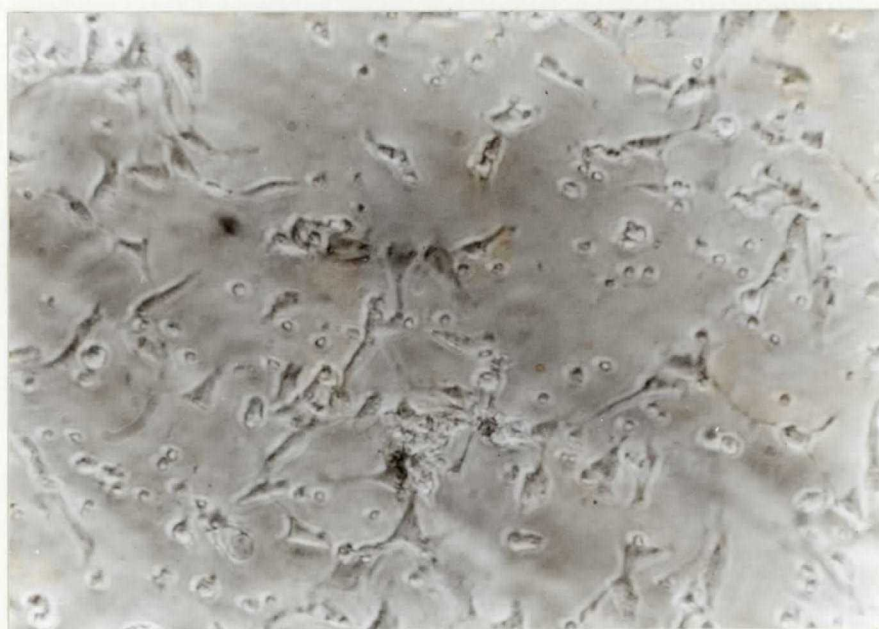
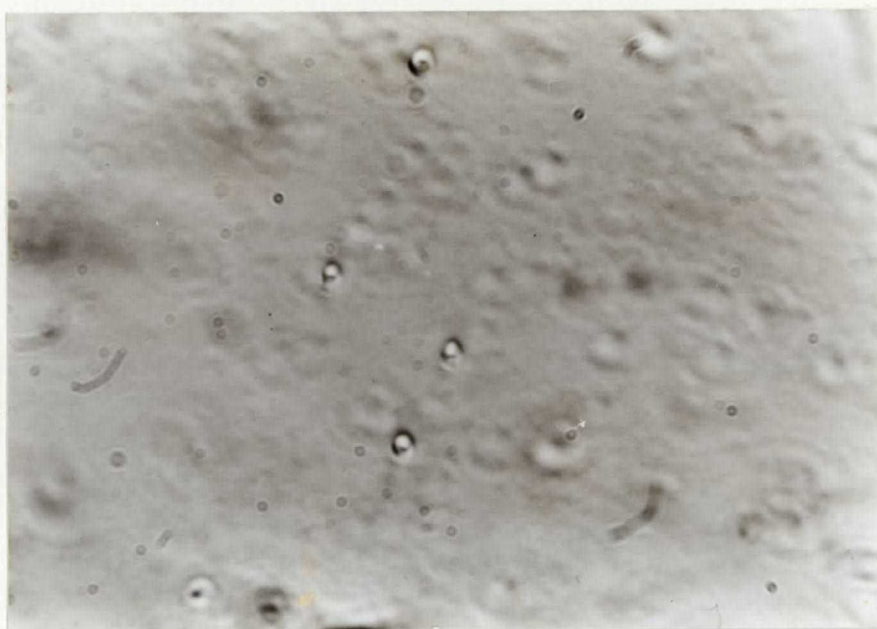


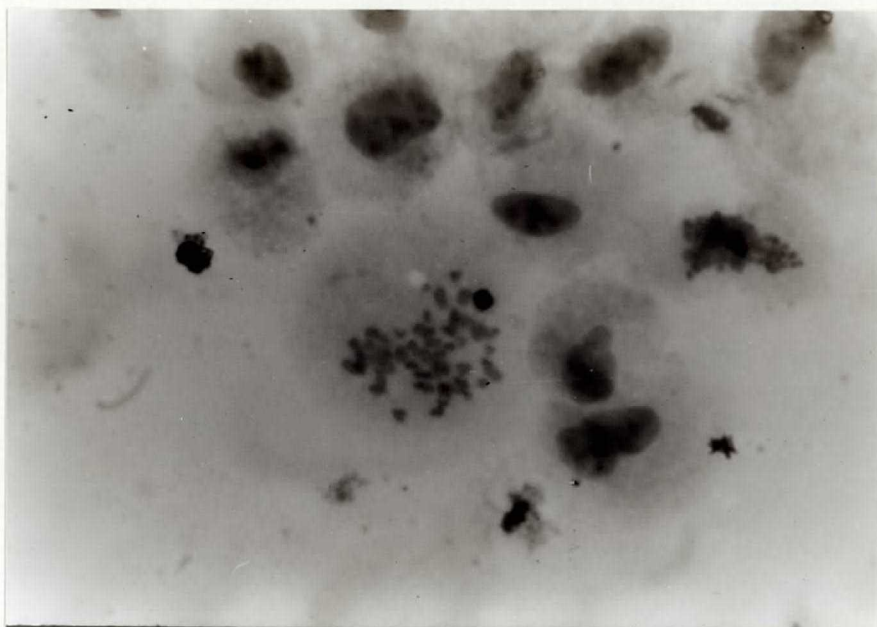
Fig. 3. Two-day culture of bovine granulosa cells in primary culture. $\times 60$.

Fig. 4. Five-day culture of bovine granulosa cells in primary culture. $\times 150$.



Fig. 5. Chromosomes of the granulosa cells of tenth culture generation. $\times 300$.

Fig. 6. Granulosa cell suspension prepared with trypsinization at the passage. $\times 150$.



Development process of the bovine granulosa cell strain(Strain JTC-35) of 224th culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald giemsa stain)

Fig. 7. One-day culture of Strain JTC-35 of 224th culture generation. $\times 10$.

Fig. 8. Two-day culture of Strain JTC-35 of 224th culture generation. $\times 10$.

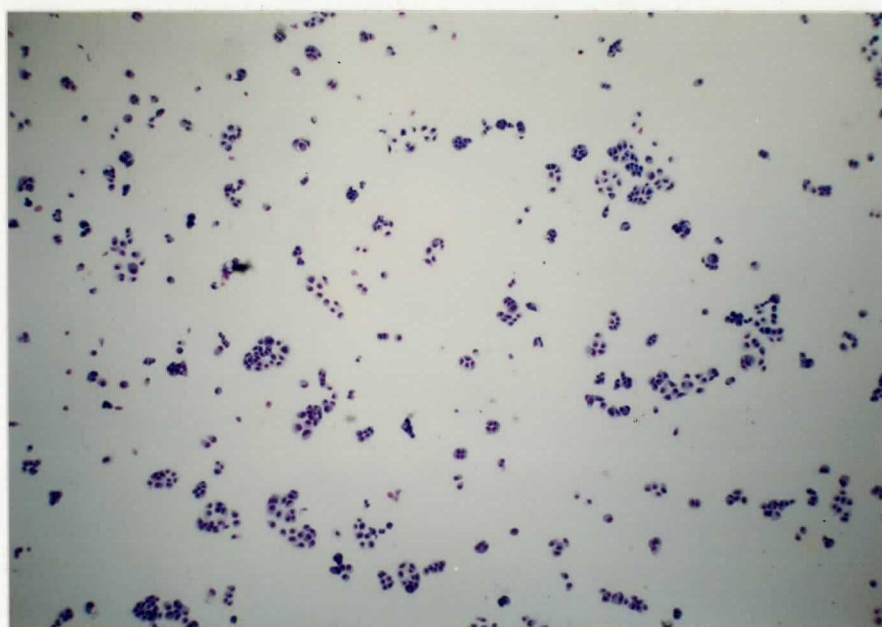


Fig. 9. Three-day culture of Strain JTC-35 of
224th culture generation. $\times 10$.

Fig. 10. Four-day culture of Strain JTC-35 of
224th culture generation. $\times 10$.

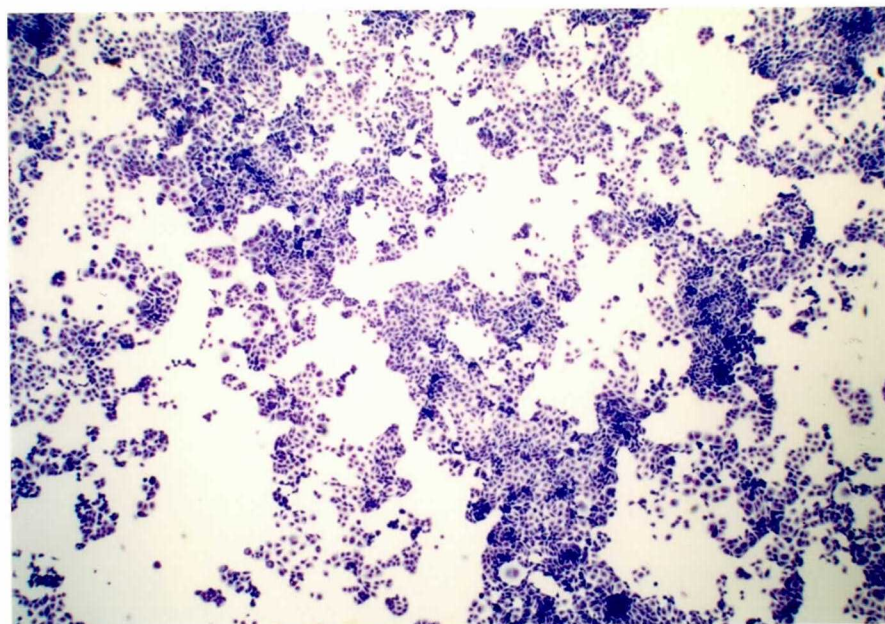
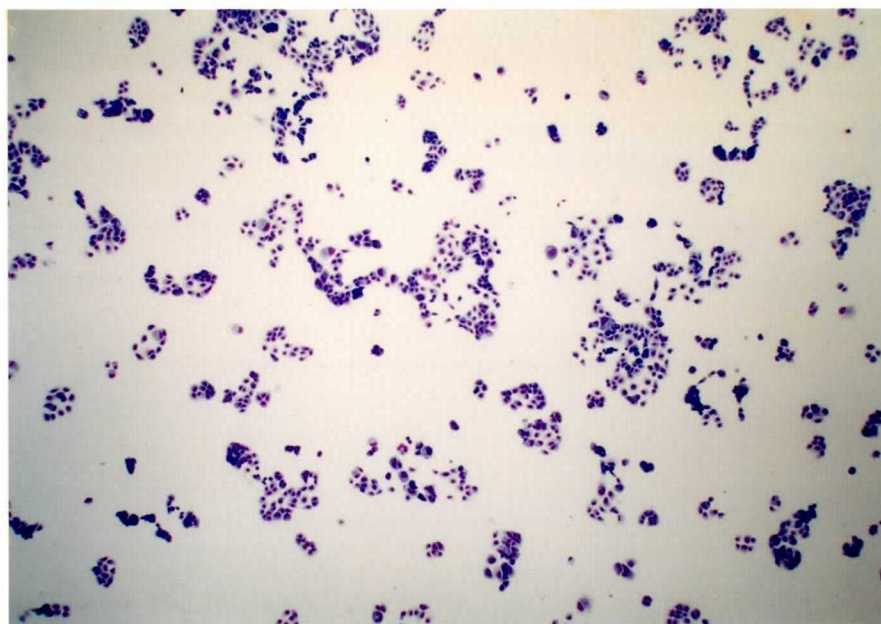


Fig. 11. Five-day culture of Strain JTC-35 of
224th culture generation. $\times 10$.

Fig. 12. Seven-day culture of Strain JTC-35 of
224th culture generation. $\times 10$.

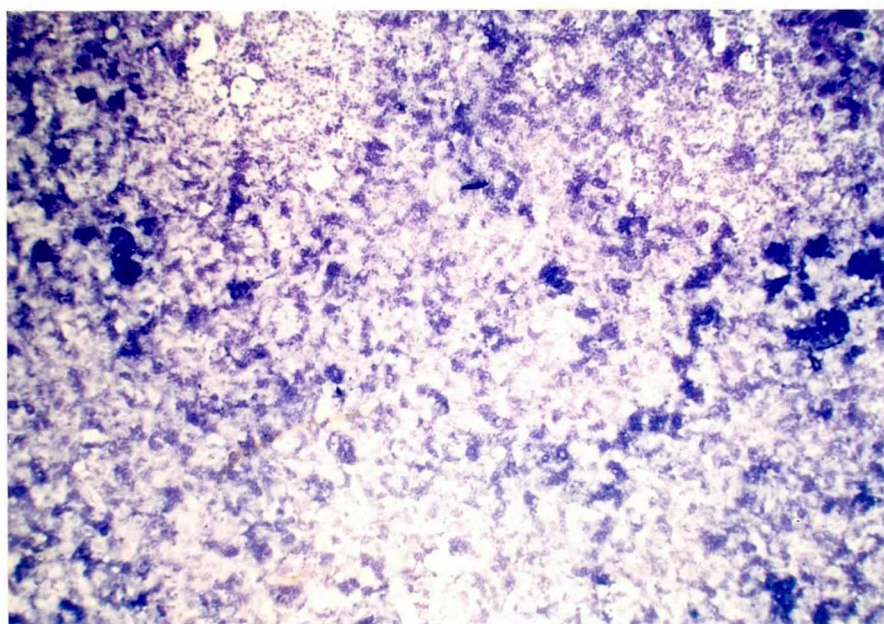
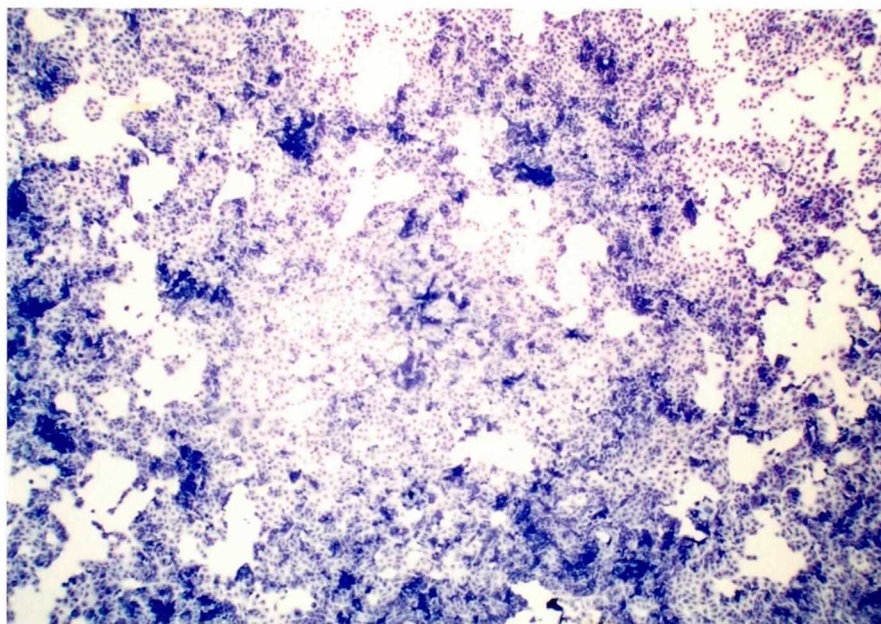


Fig. 13. Luteal cell suspension of primary culture prepared from the bovine corpus luteum by treatment with collagenase-hyaluronidase and trypsin. $\times 150$.

Fig. 14. Luteal cell suspension of primary culture prepared from the bovine corpus luteum by treatment with collagenase-hyaluronidase and trypsin. $\times 150$.

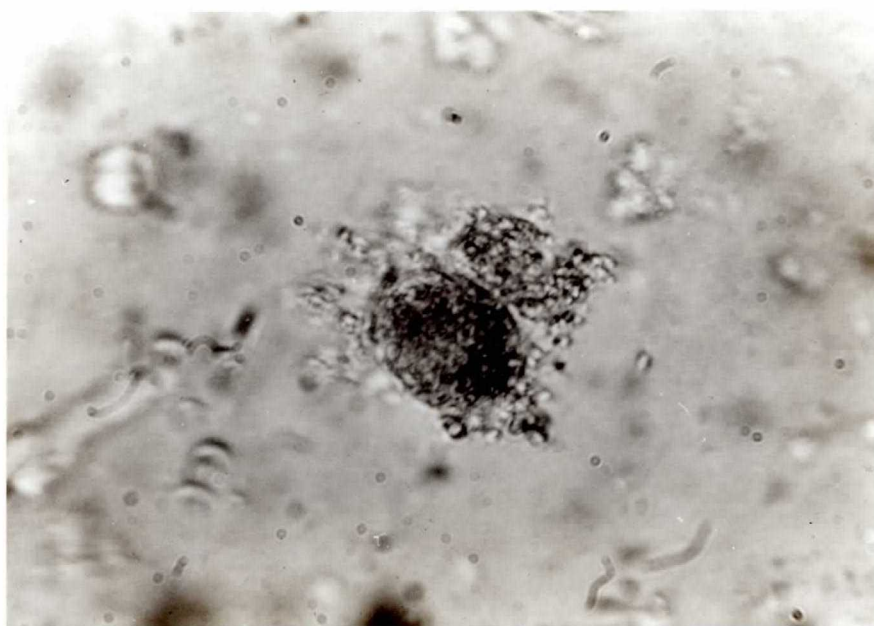
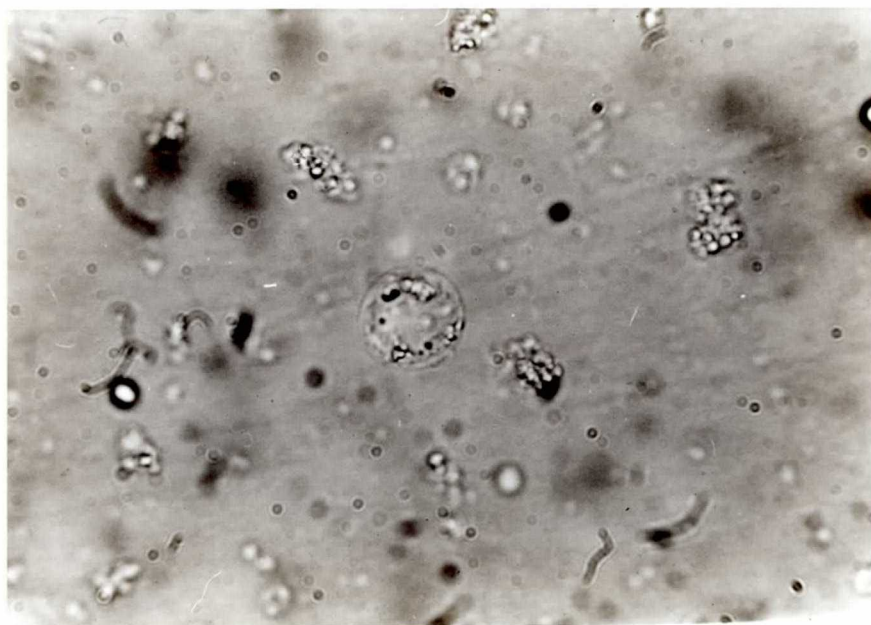


Fig. 15. The part of bovine luteal cells
prorifelated from luteal cell mass.
× 150.

Fig. 16. Luteal cell suspension prepared with
trypsinization at the passage. × 150.

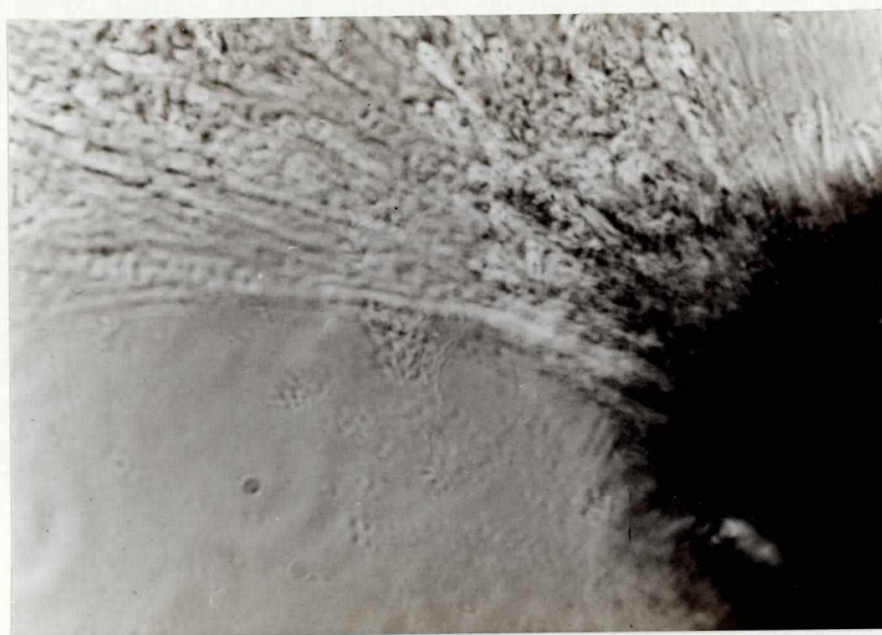


Fig. 17. The epithelial cell-like part of
bovine luteal cells of primary culture.
× 150.

Fig. 18. The fibroblast-like part of bovine
luteal cells of primary culture.
× 150.



Fig. 19. The granule-like part of bovine
luteal cells of primary culture.
× 150.

(45)

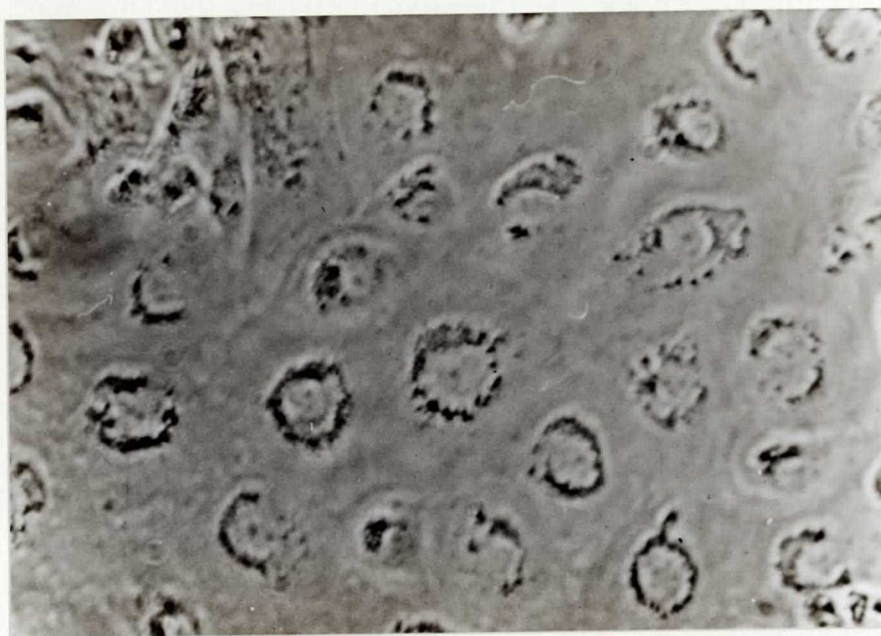


Fig. 20. Cells with vesicle.
Three-day culture of bovine luteal cells
of tertiary culture generation. $\times 150$.

Fig. 21. Cells with vesicle.
Three-day culture of bovine luteal cells
of fifth culture generation. $\times 150$.

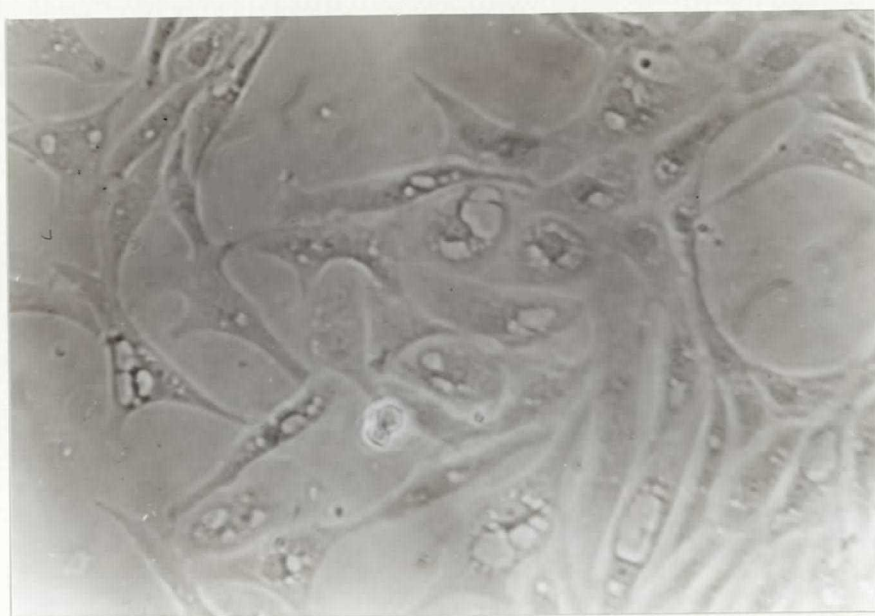


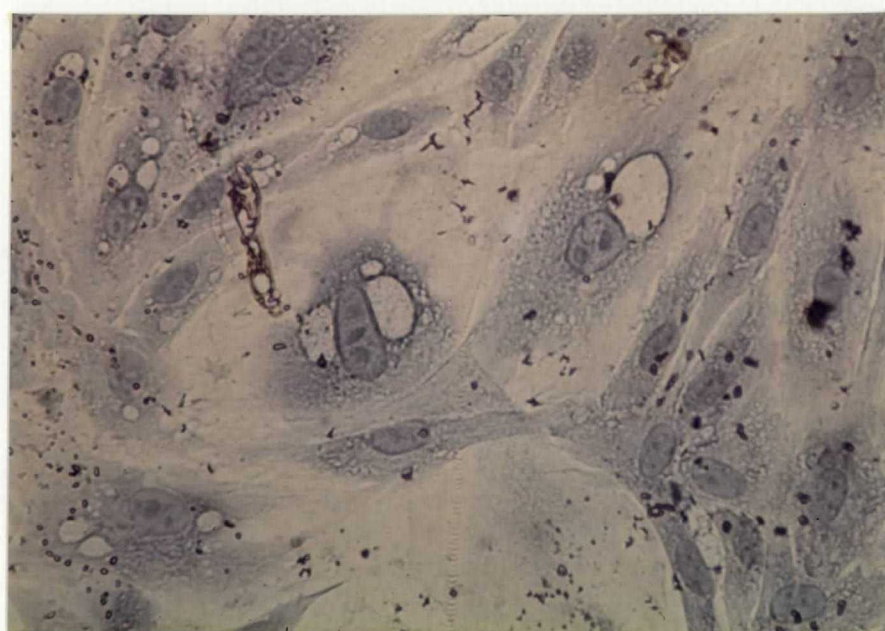
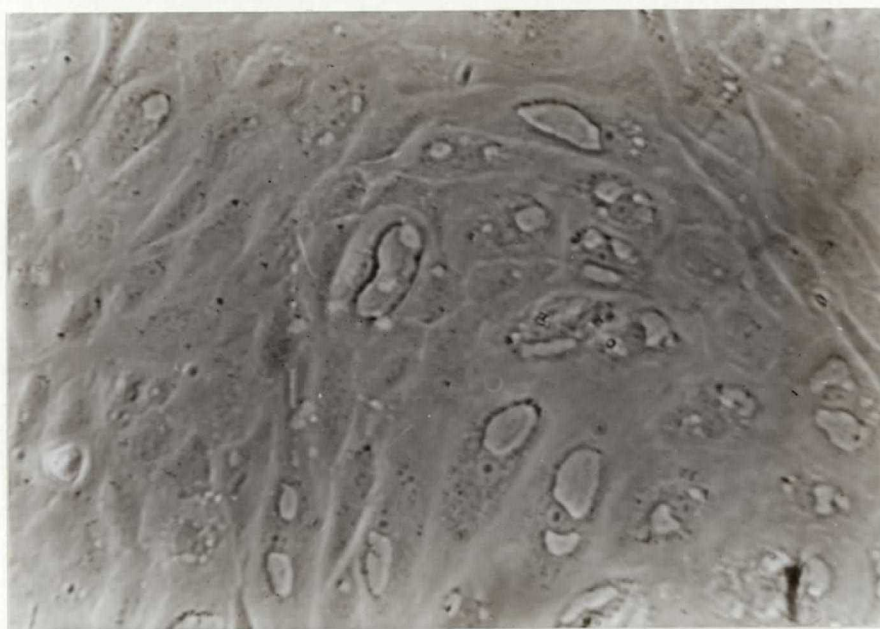
Fig. 22. Cells with vesicle.

Five-day culture of bovine luteal cells
of seventh culture generation. $\times 150$.

Fig. 23. Cells with vesicle.

Five-day culture of bovine luteal cells
of seventh culture generation. $\times 150$.

(Giemsa stain)



Development process of the bovine granulosa cell
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald
giemsa stain)

Fig. 24. One-day culture of bovine granulosa cells
of tertiary culture generation. $\times 10$.

Fig. 25. Two-day culture of bovine granulosa cells
of tertiary culture generation. $\times 10$.

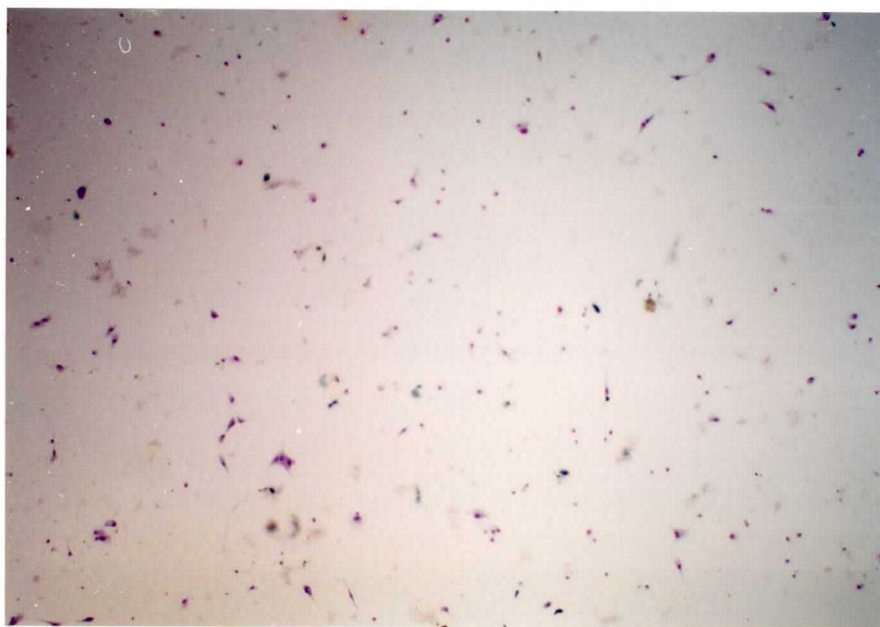


Fig. 26. Four-day culture of bovine granulosa
cells of tertiary culture generation.
×10.

Fig. 27. Five-day culture of bovine granulosa
cells of tertiary culture generation.
×10.

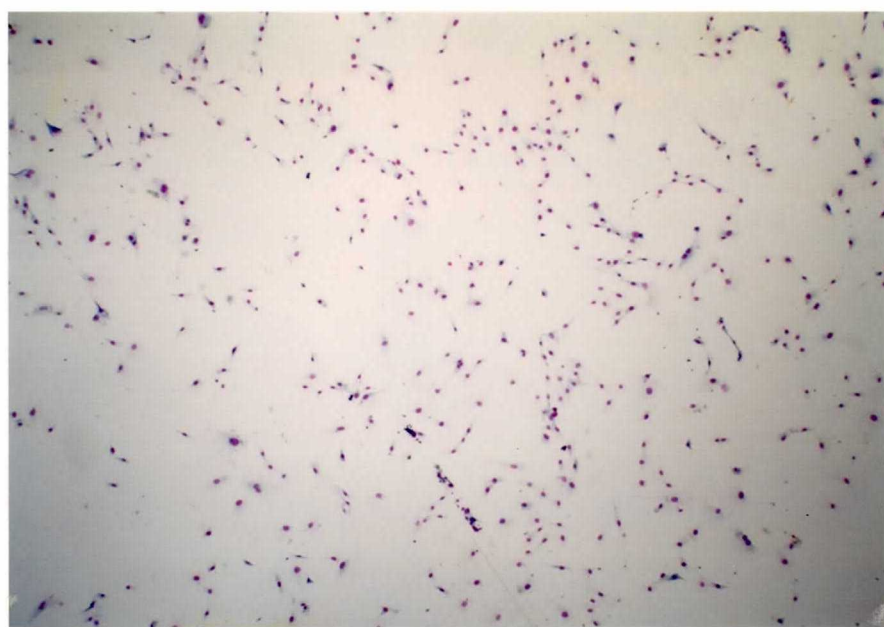
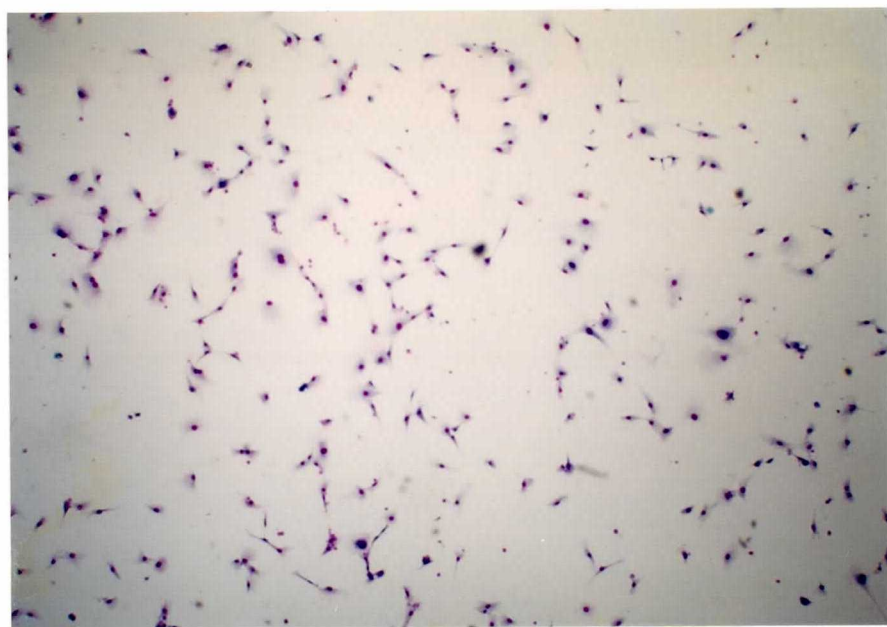


Fig. 28. Six-day culture of bovine granulosa
cells of tertiary culture generation.
×10.

Fig. 29. Seven-day culture of bovine granulosa
cells of tertiary culture generation.
×10.

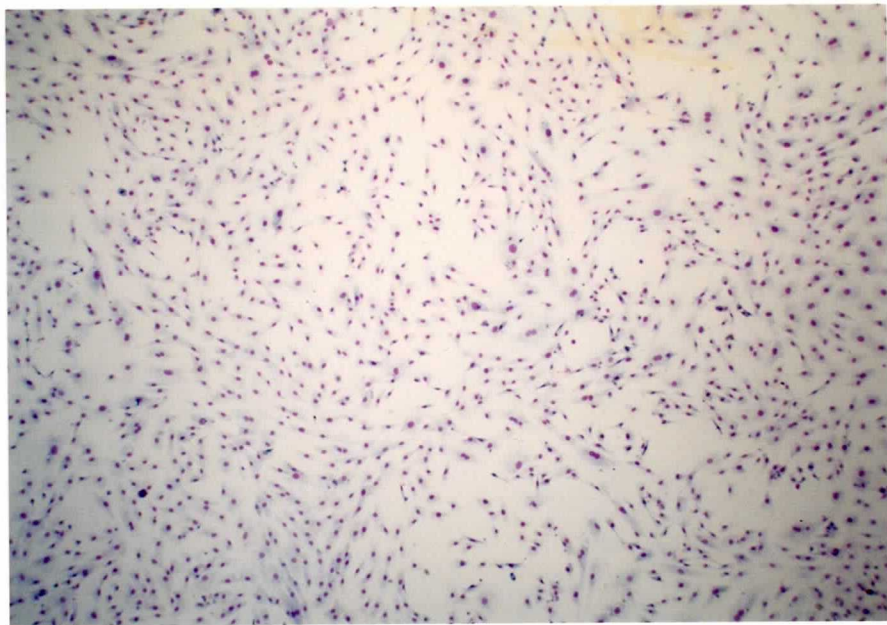
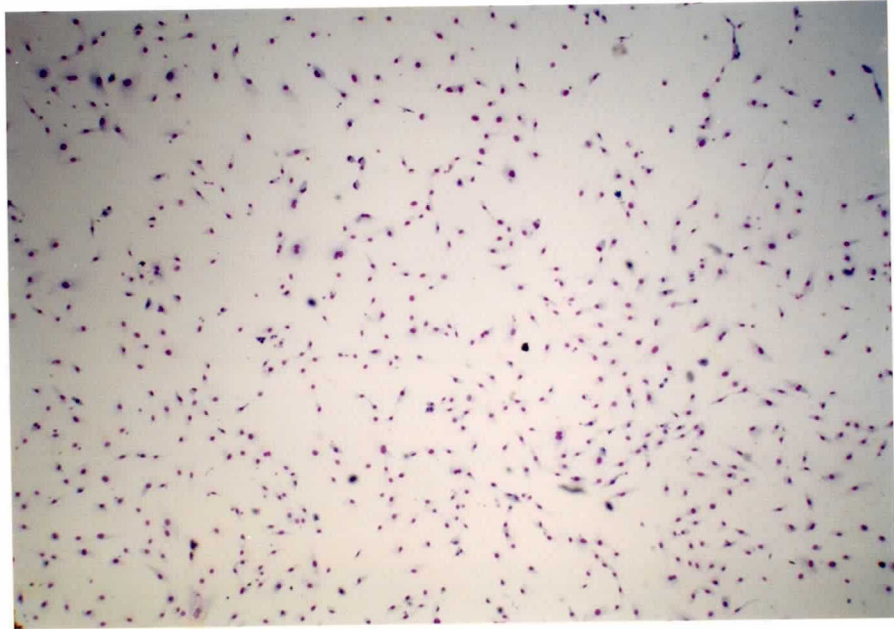
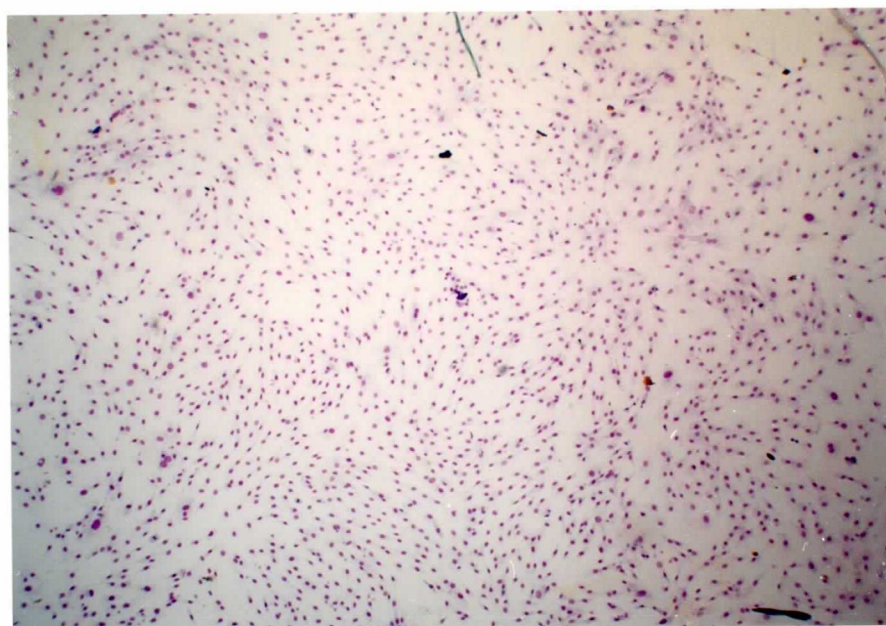


Fig. 30. Nine-day culture of bovine granulosa
cells of tertiary culture generation.
×10.



Development process of the bovine luteal cell of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald giemsa stain)

Fig. 31. One-day culture of bovine luteal cells of tertiary culture generation. $\times 10$.

Fig. 32. Two-day culture of bovine luteal cells of tertiary culture generation. $\times 10$.

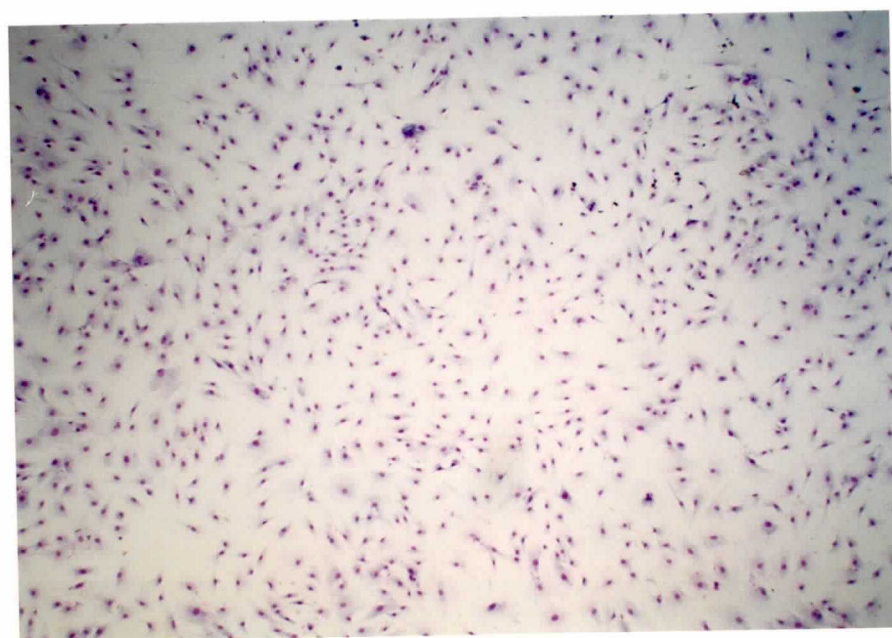
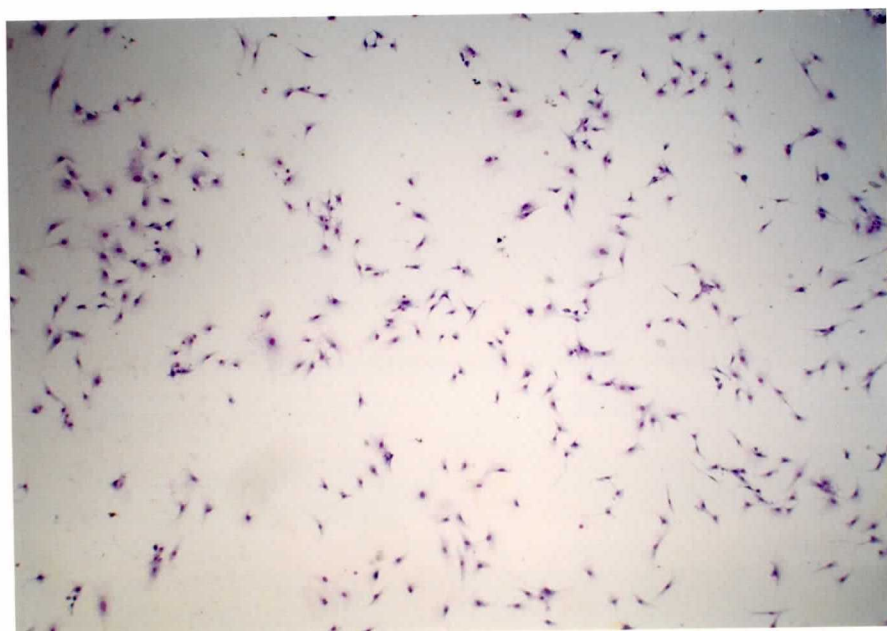


Fig. 33. Three-day culture of bovine luteal cells
of tertiary culture generation. $\times 10$.

Fig. 34. Five-day culture of bovine luteal cells
of tertiary culture generation. $\times 10$.

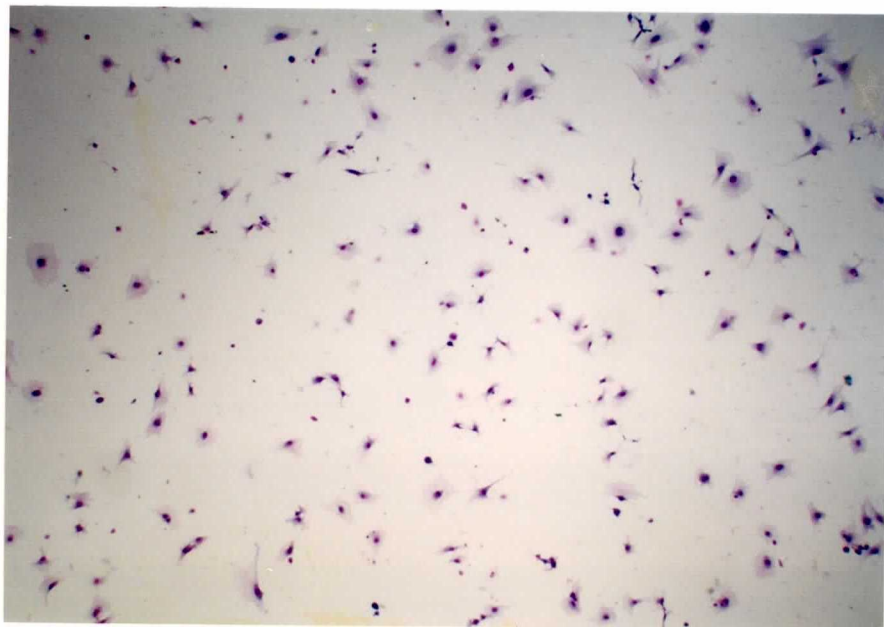
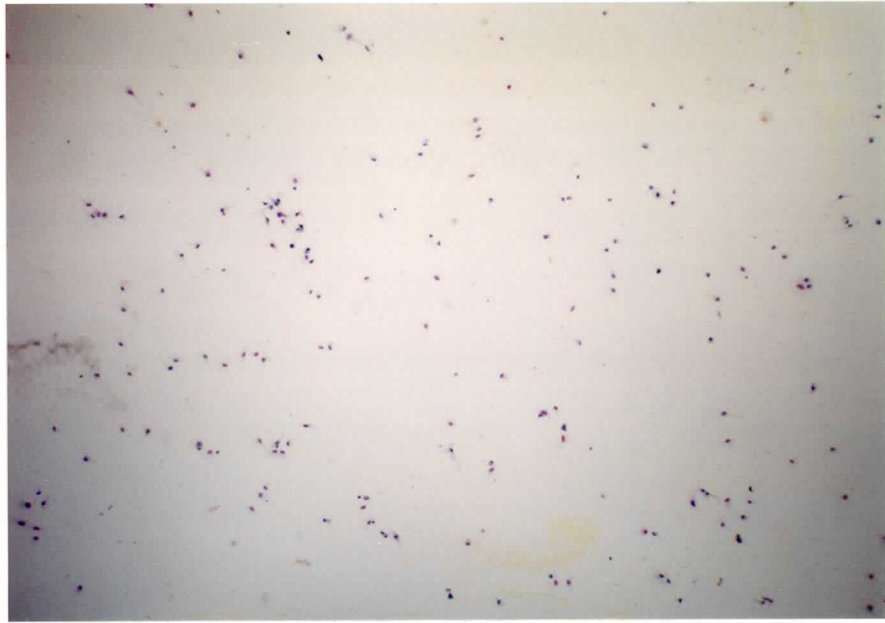
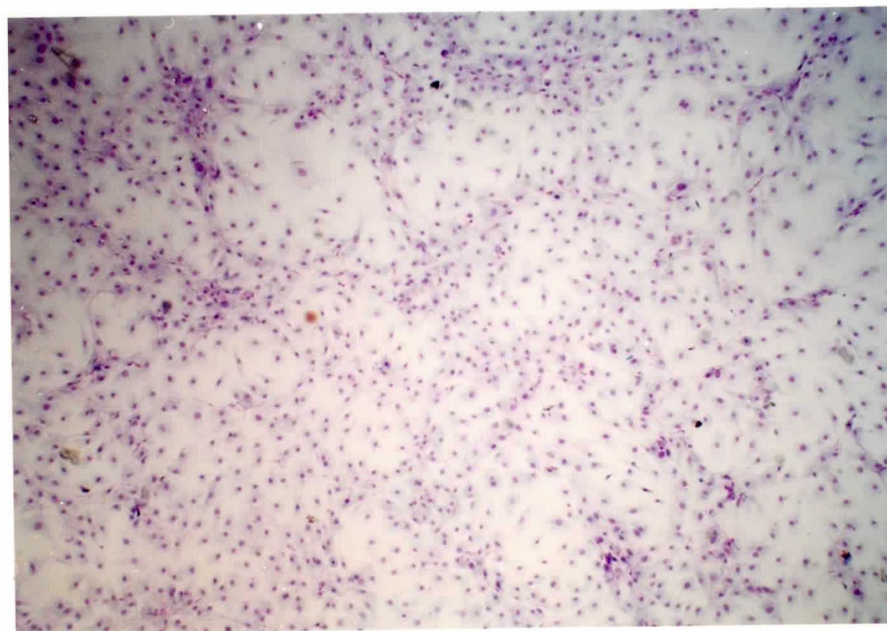
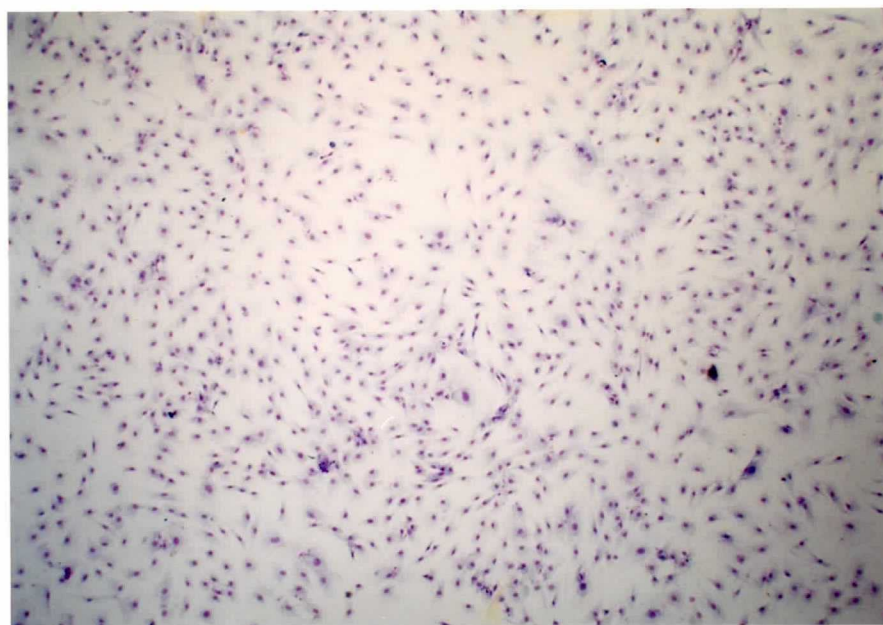


Fig. 35. Six-day culture of bovine luteal cells
of tertiary culture generation. $\times 10$.

Fig. 36. Nine-day culture of bovine luteal cells
of tertiary culture generation. $\times 10$.



オ 2 章

顆粒層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

乳牛の顆粒層細胞（以下 GC と略）及び黄体由来細胞（以下 LC と略）を培養することができたので、この章では、性腺刺激ホルモン（以下 GTH と略）に対して、培養細胞レベルにおける GC, LC 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など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ジェステロン、エストロジェンの定量も行った。

オ 1 節 実験材料及び方法

実験材料

1) GC及びLC; 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2~3mm)、中卵胞(直径4~6mm)、大卵胞(直径7~12mm)及び卵胞嚢腫(直径約30mm)由来のものに区分し、小卵胞由来GCは、同一卵巣に存在しているものを合せて供試し、他は、卵胞嚢腫由来GCを含め、すべて同一卵胞由来である。

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; 対照試験用として子宮頸癌由来の株細胞を用いた。

3) 供試GTH; HCG(フベロゲン, 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), FSH (NIH-FSH-B1), LH (NIH-LH-B10) を使用時, 培養液で溶解し濾過滅菌したものの。

4) 使用培地; オ1章の使用培地と異なるところは, FSH, LH 添加試験で, 新生仔牛血清 (米国 Flow 社製) を使用したことであり, その他の試験の使用培地は, オ1章と同様である。

実験方法

1) 細胞の採取及び初代培養法

オ1章と異なるところは, GC 採取で, あらかじめ注射器内に CMF 溶液 (Tyrode solution から Ca, Mg を除いた溶液, Ca, Mg Free の略) を 5~10ml 吸引しておき, 卵胞液と混合して採取したこと。これは, 卵胞液だけを直接そのまま採取すると遠沈前に卵胞液が凝固することがあるからである。

2) 細胞の継代，観察及び細胞数の算定

細胞の継代，観察等は，オ1章と同様であり，細胞数を算定する時期は，同一実験群の中で発育の早い whichever，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。あなわち，上澄液を採取し，これを1200rpm, 5分間遠沈し，沈渣(少数の細胞が存在)をもとの培養瓶に戻した後，上澄液は，凍結保存した。一方，培養瓶に付着した細胞に対しては，CMF溶液9mlに1%トリプシン溶液(溶媒はCMF溶液)を1ml加え，36°Cの孵卵器内に静置した。15~30分後，細胞を培養瓶の底面からピペッティングしながら剥離し，さらに細胞を個々に分離して得られた細胞浮遊液を1200rpm, 5分間遠沈して上澄液を捨て細胞を集めた。次いで，0.02% EDTA溶液を1ml加えて，ピペッティングにより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0.1M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、トーマ氏血球計算盤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剥離しない場合、または、剥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。

細胞増殖率は、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) GTHの添加

a) HCG, PMS, Prolactinの各単独添加及び混合添加

移植細胞数は、単独及び混合添加の場合とも、培養液20mlに対し40万を基準にした。使用培養瓶は、TD-40で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プロジェステロン定量用とした。

単独添加では、二通りの試験を行った。

一つは、培養液 20ml 中に HCG は、1000 MU, PMS は、500 IU, Prolactin は、100 IU を各単独添加した。供試 GC, LC は、おもに 3 代細胞を使用したか、2 代、4 代、10 代、13 代細胞も使用した。

他の一つは、HCG, PMS, Prolactin とも添加濃度に差をつけて単独添加したもので、培養液 20ml 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 細胞を用いて同様の試験を行った。

混合添加は、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 1 - A 区）、HCG 100 MU に PMS を 10, 50, 100 IU の割合に加えたもの（実験 1 - B 区）、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), Prolactin 50 IU に PMS を 10, 50, 100 IU の割合に加えたもの (実験Ⅱ-B区) である。なお, 各 GTH とともに, 比較のため単独溶液についても同時に試験した (表 3)。

α) FSH, LH の各単独添加

FSH, LH とともにそれぞれ単独で, 20ml の培養液中に 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 2500, 5000 μ g 含まれるよう添加し, そのおののおのに同数の GC あるいは, LC を移植し, 細胞の数やプロジェステロン, エストロジェン産生に及ぼす影響を, これらのホルモン無添加の Control と比較した。

4) エストロジェン, プロジェステロンの定量

Radioimmunoassay 法 (RIA 法) により, エストロジェン 3 分画の定量は, 神戸川氏

('75) の方法 (E_1 , E_2 は, 平均 60~80% の回収率で 10pg/ml まで測定可能であり, E_3 は, 平均 55~75% の回収率で 5pg/ml まで測定可能である), プロジェステロン定量は, 牧野氏ら (牧野, '73; 吉田, '73) の方法 (平均 85% の回収率で 0.2ng/ml まで測定可能である) で随時測定した。

オ2節 実験成績

1) HCG 1000 MU, PMS 500 IU,
Prolactin 100 IU 単独添加

a) 細胞増殖に及ぼす影響

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, これらのホル
モン無添加の Control と比較して表4に示
した。

すなわち, いずれの卵胞由来の GC も
Prolactin 100 IU, HCG 1000 MU, Control の順に
細胞増殖率は, 高くなることが認められた
が PMS 500 IU は, Control より低かった(表4)。

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。

次に, LC 培養に 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5に示した。HCG を添加し

た Test No. 1, 3, 4, 6, 7 の細胞増殖率の平均は、対照を 100 とした場合 206 であり、細胞数の増加がみられた。PMS を添加した 2, 5, 6, 7 の細胞増殖率の平均は、対照を 100 とした場合 67 であり、細胞数の減少がみられた。また、Prolactin を添加した 1, 7 の細胞増殖率の平均は、対照を 100 とした場合 330 であり、HCG を添加した以上に細胞数の増加がみられた (表 5)。

さらに、対照試験として Hela-S3 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、GC, LC にみられるような顕著な差が認められなかった (表 6)。

増殖した細胞の形態については、GC, LC の培養液中に HCG, Prolactin を添加することにより、細胞形態が細長くなることが認められた (図-37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44)。比較のために用いた Hela-S3 細胞では、このような所見は認められなかった (図-45, 46, 47, 48)。

6) フロジエステロン産生に及ぼす影響

GCについては, Control 0.7 ng/ml, HCG 1000 MU 0.5 ng/ml, PMS 500 IU 0.4 ng/ml, Prolactin 100 IU 0.9 ng/ml, LCについては, Control 6.4 ng/ml, HCG 1000 MU 6.0 ng/ml, PMS 500 IU 2.5 ng/ml, Prolactin 100 IU 12.0 ng/ml のフロジエステロンがそれぞれ検出された(表7)。

2) HCG, PMS, Prolactin の単独添加濃度の細胞増殖に及ぼす影響

大卵胞由来 GC, 開花期に近い黄体由来 LC 及び Hela-S3 細胞の培養液 20 ml 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8の結果をえた。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やにしたがい細胞増殖率は高くなり、LC も細胞増殖率は、GC ほどではないが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-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、添加量を増やにしたがい細胞増殖率は、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 等を添加しても、いずれも Control にくらべ顕著な差は認められなかった(表 8)。

増殖した細胞の形態は、HCG や Prolactin の添加濃度を増やにしたがい GC 及び LC は、細長くなることが認められ、特に Prolactin

には、HCG以上にその傾向が認められた
(図-49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56,
57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64)。

また、PMS添加及び比較のために用いた
Hela-S3細胞では、このような所見は
認められなかった(図-65, 66, 67, 68, 69,
70, 71, 72)。

3) HCG, PMS, Prolactin の混 合添加の影響

a) 細胞増殖に及ぼす影響

① PMS 500 IU と HCG 各濃度 との組合せ

GCの増殖率は、PMS 500 IU + HCG 10 MU
区から順に 111, 134, 160 であった。

また、PMS 500 IU 単独添加での増殖率は、
85, HCG 10, 50, 100 MU 各単独では、それぞ
れ 139, 177, 180 であった(表9のA欄)。

LCの増殖率は、PMS 500 IU と HCG 10 MU

から順に 128, 156, 195 であり, PMS 500 IU 単
独添加では, 94, HCG 10, 50, 100 MU 各単独
では, それぞれ 218, 246, 228 であった
(表9のA欄)。

(2) HCG 100 MU と PMS 各濃度と
の組合せ

GCの増殖率は, HCG 100 MU + PMS 10 IU 区
から順に 139, 142, 125 であり, HCG 100 MU
単独添加では, 141, PMS 10, 50, 100 各単独では,
それぞれ 85, 78, 67 であった(表9のB欄)。

LCの増殖率は, HCG 100 MU + PMS 10 IU 区か
ら順に 180, 161, 104 であり, HCG 100 MU 単
独添加では, 176, PMS 10, 50, 100 IU 各単独
では, それぞれ 116, 87, 75 であった(表9の
B欄)。

(3) PMS 500 IU と Prolactin 各濃
度との組合せ

GCの増殖率は, PMS 500 IU + Prolactin

5 IU区から順に 61, 67, 62であり, PMS 500 IU 単独添加での増殖率は, 42, Prolactin 5, 25, 50 IU各単独では, それぞれ 156, 173, 171であった(表10のA欄)。

LCの増殖率は, PMS 500 IU + Prolactin 5 IU 区から順に 70, 57, 78であり, PMS 500 IU 単独添加では 38, Prolactin 5, 25, 50 IU各単独では, それぞれ 147, 198, 207であった(表10のA欄)。

(4) Prolactin 50 IU と PMS 各濃度との組合せ

GCの増殖率は, Prolactin 50 IU + PMS 10 IU 区から順に 188, 96, 95であり, Prolactin 50 IU 単独添加での増殖率は, 199, PMS 10, 50, 100 IU各単独では, それぞれ 98, 61, 51であった(表10のB欄)。

LCの増殖率は, Prolactin 50 IU + PMS 10 IU 区から順に 400, 299, 289であり, 50 IU 単独添加では, 414, PMS 10, 50, 100 IU各単独で

は、それぞれ 82, 85, 67 であった(表10のB欄)。

㌸ プロジェステロン産生に及ぼす影響

表9のA欄に示した HCG 100 MU 区, B欄に示した HCG 100 MU + PMS 50 IU 区について培養液中のプロジェステロンを定量した結果, GC培養液では、それぞれ 4.3 ng/ml, 2.5 ng/ml, LC培養液では、0.2 ng/ml, 1.8 ng/ml であった(表11)。

また、表9のB欄に示した Prolactin 50 IU 区, Prolactin 50 IU + PMS 50 IU 区についてもプロジェステロンを定量した結果, GC培養液では、それぞれ 0.7 ng/ml, 2.7 ng/ml, LC培養液では、1.4 ng/ml, 2.2 ng/ml であった(表11)。

4) FSH, LH の単独添加濃度による影響

a) 細胞増殖に及ぼす影響

(1) FSH 添加の影響

GC は、最小添加量の $1\mu\text{g}/20\text{ml}$ で、その細胞数は、Control を 100 とした場合 136 の増殖率を示し、FSH 添加量を増加するにしたがい増殖も促進されるようであり、 $5000\mu\text{g}$ では 194 となった (表 12)。

LC の増殖率は、 $5\mu\text{g}$ 添加で 151 であり、添加量が増すにしたがい次々に増殖が促進され $5000\mu\text{g}$ では 501 となった (表 12)。

(2) LH 添加の影響

GC は、 $50\mu\text{g}/20\text{ml}$ 添加で 144, $5000\mu\text{g}$ で 253 と増加し、LC は、 $1\mu\text{g}$ 添加で、すでに 178 に増加し、 $50\mu\text{g}$ で 222, $5000\mu\text{g}$ では 664 となり、GC, LC とともに LH 添加により増殖が促進された (表 12)。

また、増殖した細胞の形態は、HCG, Prolactin を添加した場合と同様に GC 及び LC は、顕著に細長くなることか認められた (図-73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82,

83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96)。FSH 添加では、このような所見は認められなかった(図-97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104)。

a) エストロジェン, プロジェステロン 生成に及ぼす影響

(1) FSH 添加の影響

GC 培養でのエストロジェン生成は、FSH の各添加区とも今回の測定術式では、検出限界以下のものが多く、わずかに FSH $1\mu\text{g}$ 添加区の E_2 が 10.3 pg/ml , $10\mu\text{g}$ 添加区の E_1 が 12.1 pg/ml , $5000\mu\text{g}$ 添加区の E_1 が 12.4 pg/ml , Control の E_1 が 11.1 pg/ml を示した(表13)。

プロジェステロン生成は、Control の 4.0 ng/ml に対し、 $1\mu\text{g}$ 添加では 7.4 ng/ml , $100\mu\text{g}$ 添加では 6.0 ng/ml , $5000\mu\text{g}$ 添加では 4.6 ng/ml であり、FSH 添加は、多少、プロジェステロンの生成を促進するようにも

考えられるが、実験した範囲内での添加濃度とは必ずしも平行しない結果がみられた(表13)。

LC培養でのエストロジェン産生は、GCの場合と同様に検出限界以下のものが多かったが Control が検出限界以下であったのに対し、 $10\mu\text{g}$ 添加区の E_1 が 10.6 pg/ml , $100\mu\text{g}$ 添加区の E_1 が 12.3 pg/ml , $1000\mu\text{g}$ 添加区の E_1 が 11.2 pg/ml , $5000\mu\text{g}$ 添加区の E_1 が 24.2 pg/ml , E_2 が 14.6 pg/ml を示した(表13)。

プロゲステロン産生は、Control の 1.7 ng/ml に対し、FSH $1\mu\text{g}$ 添加では 1.8 ng/ml , さらに添加量が増加するにしたがい漸増し、 $5000\mu\text{g}$ 添加では 11.1 ng/ml となった(表13)。

(2) LH 添加の影響

GC培養でのエストロジェン産生は、LH $100\mu\text{g}$ 添加区の E_1 が 10.1 pg/ml , $5000\mu\text{g}$ 添加区の E_1 , E_2 が、それぞれ 13.0 , 12.0 pg/ml であり、Control の E_1 が 12.4 pg/ml , E_2 が 10.5

pg/ml にくらべ、その産生を刺激したとは考えられない結果を得た(表14)。

プロジェステロン産生は、少量添加で若干促進されるようであるが、大量では、かえって抑制される所見がみられた(表14)。

LC培養でのエストロジェン産生は、Controlの E_1 が12.1 pg/mlを示し、1 μ g 添加区の E_1 が11.5 pg/ml、 E_2 が15.9 pg/ml、10 μ g 添加区の E_1 が12.0 pg/ml、100 μ g 添加区の E_2 が11.0 pg/ml、5000 μ g 添加区の E_1 が12.6 pg/mlを示したほかは、検出限界以下であった(表14)。

プロジェステロン産生は、Controlで10.6 ng/mlを示し、LH 1 μ g 添加では7.6 ng/mlであり、添加量を増やにしたがいに漸減し、5000 μ g 添加で2.9 ng/mlとなり、添加量と反比例するような結果が得られた(表14)。

これらのことから GC, LC培養に対するLHの影響は、初期の細胞増殖には、促進的に作用するか、ホルモン産生、分泌は、これ

と必ずしも平行しない結果が得られた。

オ 3 節 考 察

胎盤性GTHであるPMS及びHCGが卵胞の発育に関し、临床上、効果を発揮することはよく知られているが、本実験でHCG及びProlactinは、培養GC及びLCに対し、その増殖を促進し、特に牛の卵巣に対しては、その作用の判然としていないProlactinに(Bartosik et al., '67; Hoffmann et al., '74; Hansel et al., '70), HCGに劣らぬ効果が認められた。

また、PMSは、予想に反してGC及びLC両細胞に対し、*in vitro*でその増殖を抑制する結果を示した。

なお、対照試験として行ったHela-S3細胞を用いた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ず、Controlとも差が見られなかった。

すなわち、これらの点からみて、培養GC,

LCは、細胞増殖の面で、GTHに対して特異的な感受性を有しているようである。

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 Hoffman ら ('74) によると黄体刺激因子は、Prolactin より LH が主役であるといわれており、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 に対して刺激作用的な作用を及ぼすことが認められ、今後、検討すべき年かかりが得られたと思われる。

次に、本実験では、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顕著な差は見られなかった。

しかし、Channing ら ('74) は、*in vitro* の実験で、豚の発情周期中の小 (1~2mm)、中 (3~5mm)、大 (6~12mm) 卵胞由来 GC の¹²⁵I-HCG 結合性は、小、中、大卵胞由来 GC の順に高くなり、特に、大卵胞由来 GC は、

大卵胞のある同一卵巣や他側の卵巣に存在する小卵胞由来GCの10~1000倍以上の高い結合性を示したと報告している。ほぼ同様な事実がSchombergら('72)の短時間培養によっても報告されている。また、Channing('73)は、豚の小、中、大卵胞由来GCをHCGなしに20分間培養した後の培養液中のCyclic-3',5'-AMP (CAMP)レベルは、小、中卵胞由来GCのものより、大卵胞由来GCのものの方が高かったと報告している。これらの報告(Channing et al., '74; Schomberg et al., '74; Channing, '73)から、小、中、大卵胞由来GC間には、HCGまたはGTHに対する感受性に差があることが考えられる。

一方、今回の実験では、屠殺直後の卵巣から、卵胞の大きさ別にそれぞれGCを採取、分類したために、厳密な意味でのステージによる分類とは異なることや、HCGに対するGCの感受性を細胞増殖率だけで比

較することには無理があるとも思われるので、さらに適切な検査項目等を検討する必要があると考えられた。

また、GC培養液中にプロジェステロンが検出されたことは、オし章でも述べたが、排卵前の卵胞が一過性に分泌されるプロジェステロン産生と関係があるかもわからない。

細胞増殖数と産生プロジェステロン量との関係は、細胞1個あたりとして見た場合は、比例した値が必ずしも得られなかったこともあるが、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。

GTH相互の協力作用については、Fevoldら('37)が、LHは、予めFSHによって刺激された卵胞に対してのみ、その発育を促進し、排卵を起こさせる作用があることを実証して以来、多くの研究がなされ、GTH相互の協力作用があることは、今日

では一般に信じられている。

本実験で、GTH相互の協力作用が *in vitro* で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、プロジェステロン産生については、細胞増殖率に見られるようなPMSの抑制的影響は、認められが一例外を除いて、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。

つぎに、下垂体前葉性のFSH、LHについてPMS、HCGの成績と比較するため、これと同様な術式により実験を行った結果、FSHは、GC及びLCに対し、増殖促進効果のあることが認められ、PMSとは培養細胞レベルでの作用機序に差のあることが確認された。

プロジェステロン産生に及ぼす影響は、GC培養についてみると、添加FSH量による

差は、それほど顕著でないが、プロジェステロン分泌を促進するようであり、LC培養では、FSH量に比例してプロジェステロン分泌が、かなり顕著に増加しており、この点もPMSと異なる成績が得られた。

エストロゲン産生に及ぼす影響は、GC、LC培養とも測定限界以下のものばかりであったため、はっきりしたことはわからないが、少なくとも顕著な促進あるいは、抑制効果があったとは考えられない成績であり、はっきりした傾向はないように思われた。しかし、増殖を完了した後も、継続して若干の期間、観察する必要があるかもわからない。

LHについては、HCGとそれほど変わった点は認められず、GC及びLCの増殖を強く促進した。ホルモン産生については、GC培養に添加した場合、少量では、プロジェステロン産生を促進したが、大量では、かえって抑制し、LCに対しても $10\mu\text{g}/20\text{ml}$

以上の濃度では、抑制的な結果が得られた。
なお、エストロゲン生成については、明瞭な傾向は把握できなかった。

LH添加量が増すにともないGC, LCともプロジェステロン生成が抑制されたが、細胞増殖は、反対に強く促進された。この結果は、細胞分裂の旺盛な時期には、分泌機能の発現が抑制されることを示唆しており、細胞増殖と分泌機能との時間的な関係は、今後、検討すべき問題と考えられる。

Table 3. List of combined addition of PMS,
HCG and Prolactin to the 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

B		100		50
	10	100	10	50
	50	100	50	50
	100	100	100	50
	10		10	
	50		50	
	100		100	

Control	0	0	0	0

Note: U/20ml medium

Table 4. Effects of HCG, PMS and Prolactin on granulosa cell(GC) development in culture

GC from	Test Passage		GTH added to 20ml medium		
	No.	number of GC used	HCG 1000 MU	PMS 500 IU	Prolactin 100 IU
			No. of cells(%)	No. of cells(%)	No. of cells(%)
Small-sized follicles (1-2mm)	1	3	*413(134)	*190(61)	*733(235)
	2	3	585(190)	150(48)	1450(472)
	3	3	482(157)	156(50)	1140(371)
	Mean		(160)	(53)	(323)
Medium-sized follicles (3-6mm)	1	3	285(164)	100(57)	570(329)
	2	3	290(167)	100(57)	550(317)
	Mean		(165)	(57)	(323)
Large-sized follicles (7-12mm)	1	2	1150(139)	650(78)	
	2	4	956(117)	60(7)	1315(161)
	3	2	270(150)	86(47)	606(336)
	4	2	153(288)		272(513)
	Mean		(173)	(44)	(336)
Cystic follicles	1	3	840(202)	330(79)	1240(298)
	2	3	1130(137)	590(78)	1465(195)
	Mean		(169)	(78)	(246)

* $\times 10^3/20\text{ml}$ medium

(%): Compared with control without GTH(as 100%).

Table 5. Effects of GTH on luteal cell(LC) development
in culture

LC used	A		B		C	D	E	
Passage number of LC used	3		10	13	2	3		
Culture period (days)	4	4	4	4	5	7	7	
Test No.	1	2	3	4	5	6	7	Mean
Control(intact)	1010* (100)	1132 (100)	784 (100)	490 (100)	310 (100)	437 (100)	425 (100)	(100)
HCG 1000 MU	1720 (170)		1650 (210)	1620 (330)		730 (167)	663 (156)	(206)
PMS 500 IU		820 (72)			172 (55)	323 (73)	295 (69)	(67)
Prolactin 100 IU					1445 (330)	1405 (330)		(330)

* $\times 10^3/20\text{ml}$ medium

(%): Compared with control without GTH(as 100%).

A- E: Different corpora lutea from which LC was obtained.

Table 6. Effects of GTH on Hela-s3 cell development
in culture

Culture period (days)	3	4	4	4	5	5	5	Mean
Control	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)
Prolac- tin 100 IU	3630 (101)	780 (103)	1028 (166)	2125 (93)	1805 (102)	820 (114)	1030 (122)	(114)

* $\times 10^3$ /20ml medium

(%): Compared with control without GTH(as 100%).

Table 7. Effects of HCG, PMS and Prolactin on cell development and Progesterone production of granulosa and Luteal cells in culture

	Granulosa cell culture		Luteal cell culture	
	No. of cells (%)	Progesterone (ng/ml) **	No. of cells (%)	Progesterone (ng/ml) **
Control	*173(100)	0.7	*437(100)	6.4
HCG 1000 MU	285(164)	0.5	730(167)	6.0
PMS 500 IU	100(58)	0.4	323(73)	2.5
Prolactin 100 IU	570(329)	0.9	1405(330)	12.0

* $\times 10^3/20\text{ml}$ medium

** determined by RIA.

Table 8. Effect of GTH on cell development of the granulosa, luteal and Hela-s3 cells in culture, expressed as % of number of cells against that in control(as 100%).

		Granulosa cell	Luteal cell	Hela-s3 cell
Control(without GTH)		100%	100%	100%
HCG	500 MU	172	177	72
	1000	261	198	103
	2000	276	202	98
	3000	355	297	92

PMS	250 IU	73	115	94
	500	82	96	97
	1000	74	78	106
	2000	75	103	97

Prolactin				
	5 IU	100	122	100
	25	180	122	100
	50	254	303	105
	100	246	372	101
	200	160	381	91

Table 9. Effects of combined addition
of PMS and HCG on cell development of
the granulosa and luteal cells
in culture

Group	GTH used		Cell development(%) [*]	
	PMS(IU)	HCG(MU)	Granulosa cell	Luteal cell
A	500		85	94
	500	10	111	128
	500	50	134	156
	500	100	160	195
		10	139	218
		50	177	246
		100	180	228
B		100	141	176
	10	100	139	180
	50	100	142	161
	100	100	125	104
	10		85	116
	50		78	87
	100		67	75
Control	0	0	100	100

* Compared with control without GTH(as 100 %).

Table 10. Effects of combined addition of
PMS and Prolactin on cell development of
the granulosa and luteal cells
in culture

Group	GTH used		Cell development(%)*	
	PMS(IU)	Prolac- tin(IU)	Granulosa cell	Luteal cell
A	500		42	38
	500	5	61	70
	500	25	67	57
	500	50	62	78
		5	156	147
		25	173	198
		50	171	207
		50	199	414
B	10	50	188	400
	50	50	96	299
	100	50	95	289
	10		98	82
	50		61	85
	100		51	67
Control	0	0	100	100

* Compared with control without GTH(as 100 %).

Table 11. 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)	Prolac- tin(IU)	Cell develop- ment(%)*	Progeste- rone ** (ng/ml)	Cell develop- ment(%)*	Progeste- rone ** (ng/ml)
	100		141	4.3	176	0.2
50	100		142	2.5	162	1.8
<hr/>						
		50	199	0.7	414	1.4
50		50	96	2.7	299	2.2

* Compared with control without GTH(as 100%).

** determined by RIA.

Table 12. Effects of FSH and LH on cell development of the granulosa and luteal cells in culture, expressed as % of number of cells against that in control without GTH(100%).

FSH (μ g/20ml)	Granulosa cell	Luteal cell	LH (μ g/20ml)	Granulosa cell	Luteal cell
Control (without GTH)	100%	100%	Control (without GTH)	100%	100%
1	136	104	1	94	178
5	138	151	5	100	177
10	146	167	10	105	177
50	156	166	50	144	222
100	164	173	100	135	260
250	151	222	250	111	307
500	156	219	500	134	392
1000	159	219	1000	128	475
2500	159	286	2500	192	495
5000	194	501	5000	253	664

Table 13. Effects of FSH on cell number and progesterone, Estrogen production by the granulosa and luteal cells in culture

FSH (μ g/20ml)	Granulosa cells			Luteal cells		
	No. of cells $\times 10^4$ (%)	Progesterone ng/ml	Estrogen pg/ml	No. of cells $\times 10^4$ (%)	Progesterone ng/ml	Estrogen pg/ml
1	190 (142)	7.4	<10.0* 10.3 <5.0	76 (104)	1.8	<10.0* <10.0 <5.0
10	182 (136)	5.0	12.1 <10.0 <5.0	122 (167)	2.1	10.6 <10.0 <5.0
100	201 (151)	6.0	<10.0 <10.0 <5.0	126 (172)	4.5	12.3 <10.0 <5.0
1000	202	2.2	<10.0 <10.0 <5.0	160 (219)	10.4	11.2 <10.0 <5.0
5000	280 (210)	4.6	12.4 <10.0 <5.0	366	11.1	24.2 14.6 <5.0
Control	133.3 (100)	4.0	11.1 <10.0 <5.0	73 (100)	1.7	<10.0 <10.0 <5.0

* Figures of top, middle, and bottom in each column represent the values of estrone, estradiol, and estriol respectively.

<: undetectable at the level indicated.

Table 14. Effect of LH on cell number and progesterone, estrogen production by the granulosa and luteal cells in culture

LH (μ g/20ml)	Granulosa cells			Luteal cells		
	No. of cells $\times 10^4$ (%)	Progeste- rone ng/ml	Estro- gen pg/ml	No. of cells $\times 10^4$ (%)	Progeste- rone ng/ml	Estro- gen pg/ml
1	84 (104)	11.4	<10.0* <10.0 <5.0	156 (250)	7.6	11.5* 15.9 <5.0
10	95 (118)	1.1	<10.0 <10.0 <5.0	140 (222)	6.8	12.0 <10.0 <5.0
100	93.5 (116)	2.5	10.1 <10.0 <5.0	248 (393)	4.1	<10.0 11.0 <5.0
1000	96.5 (119)	0.8	<10.0 <10.0 <5.0	299 (474)	3.9	<10.0 <10.0 <5.0
5000	246 (305)	0.2	13.0 12.0 <5.0	418 (663)	2.9	12.6 <10.0 <5.0
Control	80.5 (100)	1.1	12.4 10.5 <5.0	63 (100)	10.6	12.1 <10.0 <5.0

* Figures of top, middle, and bottom in each column represent the values of estrone, estradiol, and estriol respectively.

<: undetectable at the level indicated.

(104)
Effects of GTH(HCG,PMS and Prolactin resp.) on bovine
granulosa cell development of tertiary culture
generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald giemsa
stain)

Fig. 37. Control. $\times 10$.

Fig. 38. 1000MU HCG. $\times 10$.

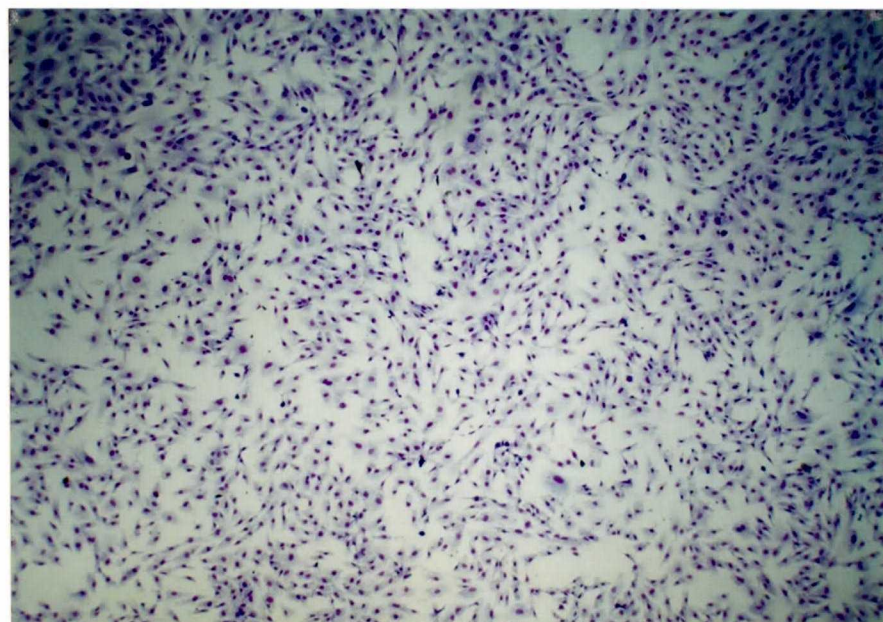
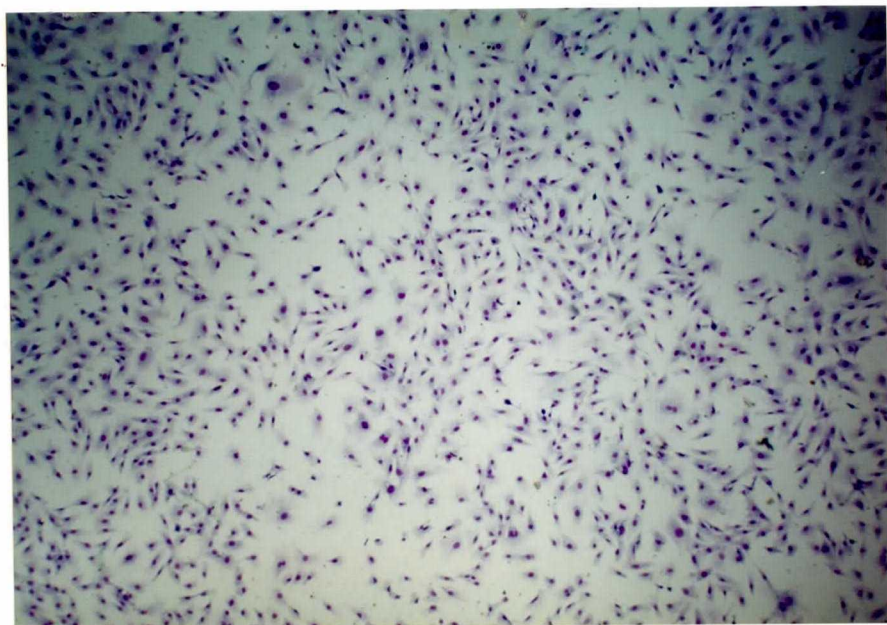
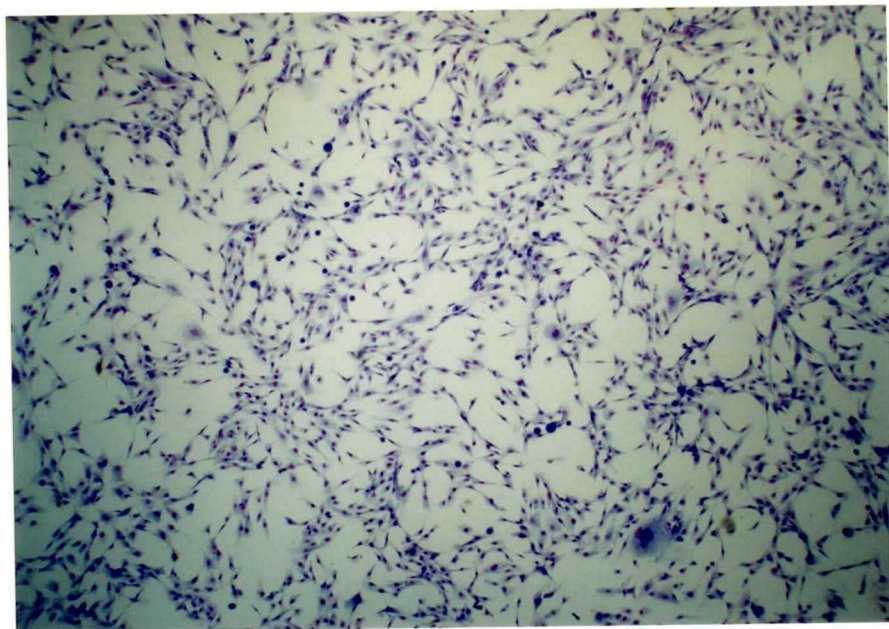
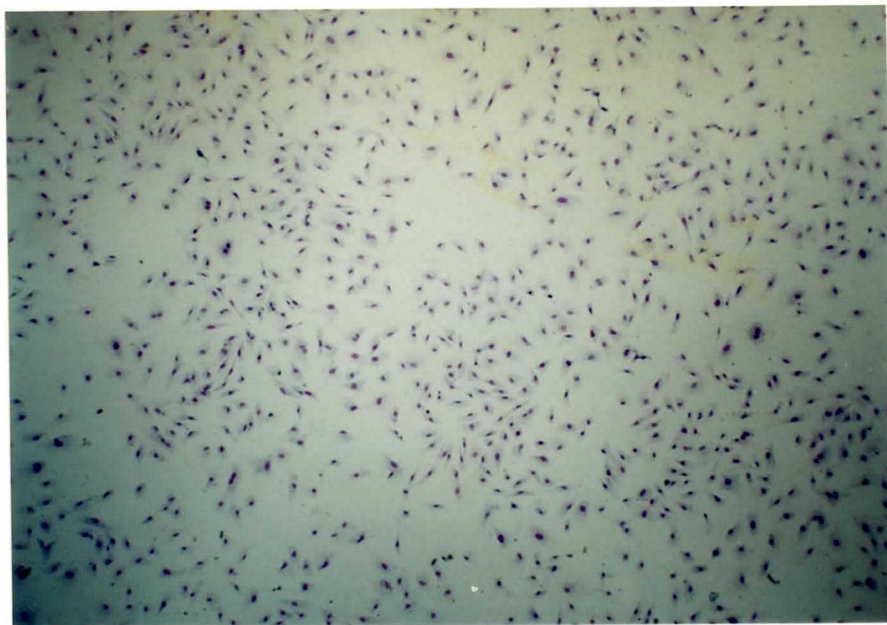


Fig. 39. 500IU PMS. $\times 10$.

Fig. 40. 100IU Prolactin. $\times 10$.



(108)

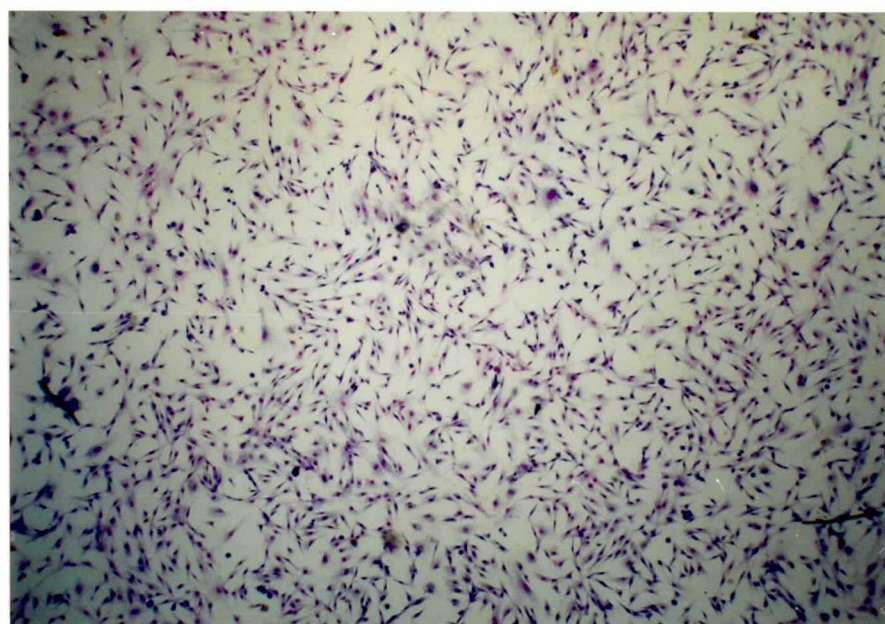
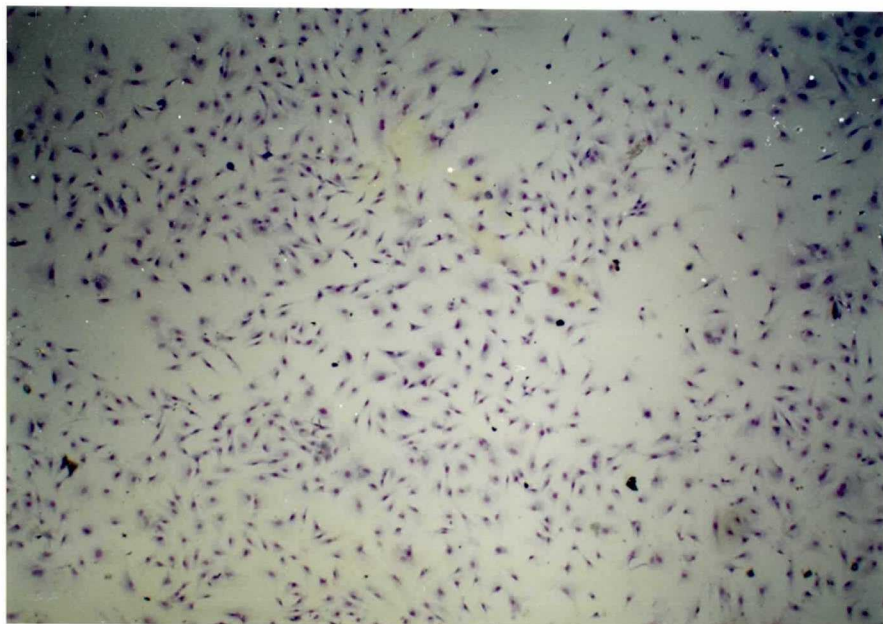
Effects of GTH(HCG,PMS and Prolactin resp.) on bovine
luteal cell development of tertiary culture generation.
(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May- gruenwald giemsa
stain)

Fig. 41. Control. $\times 10$.

Fig. 42. 1000MU HCG. $\times 10$.

Fig. 43. 500IU PMS. $\times 10$.

Fig. 44. 100IU Prolactin. $\times 10$.



(112)
Effects of GTH(HCG,PMS and Prolactin resp.) on Strain
Hela-s3 development of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald giemsa
stain)

Fig. 45. Control. $\times 10$.

Fig. 46. 1000MU HCG. $\times 10$.

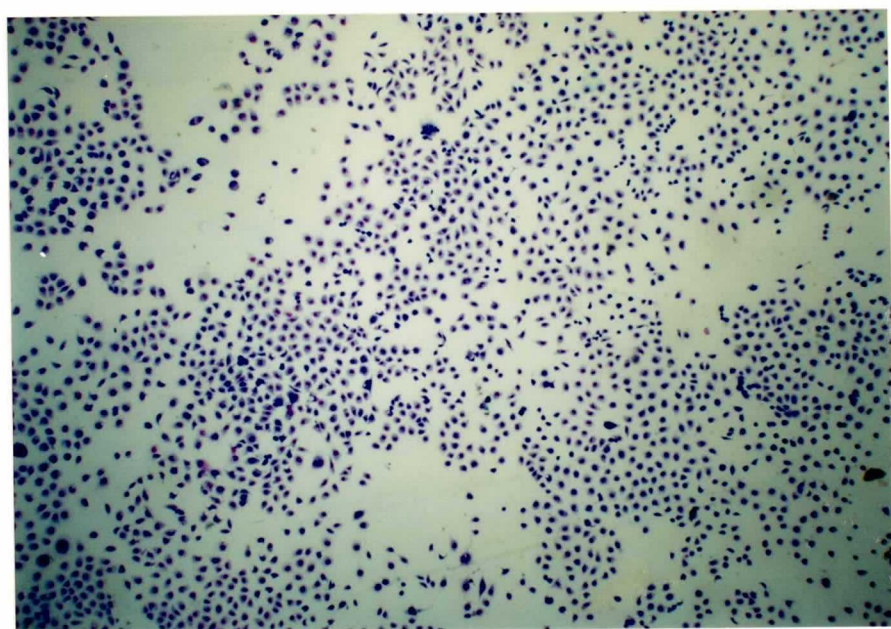
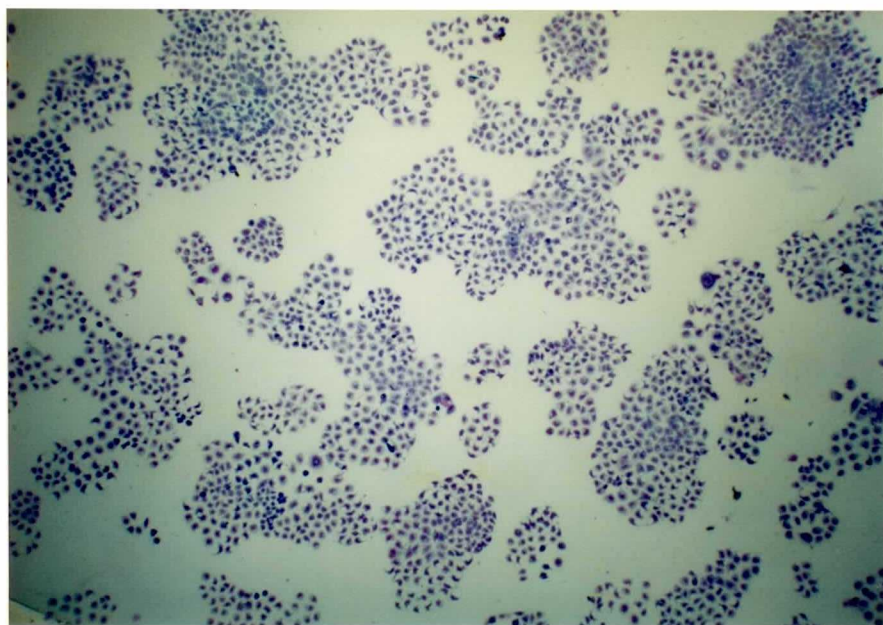
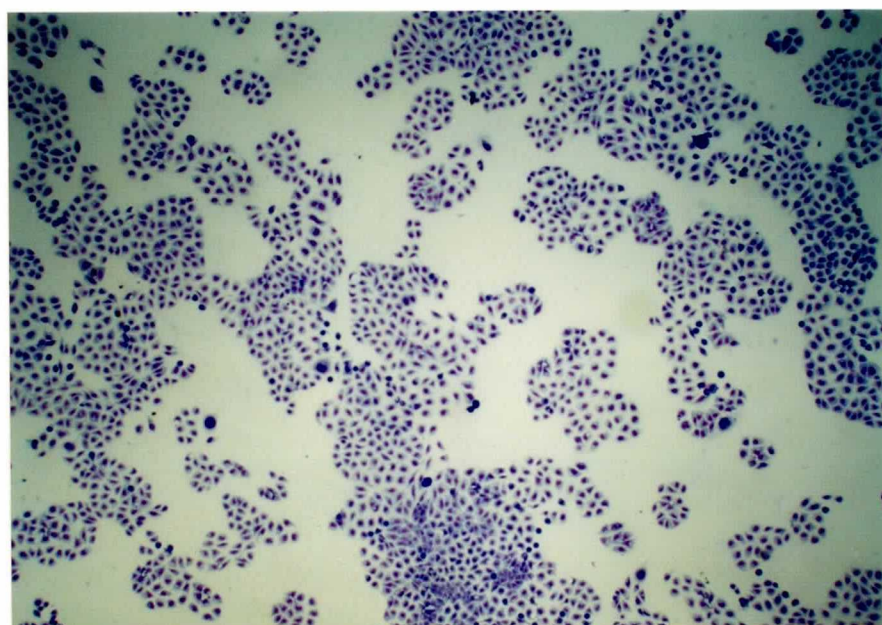
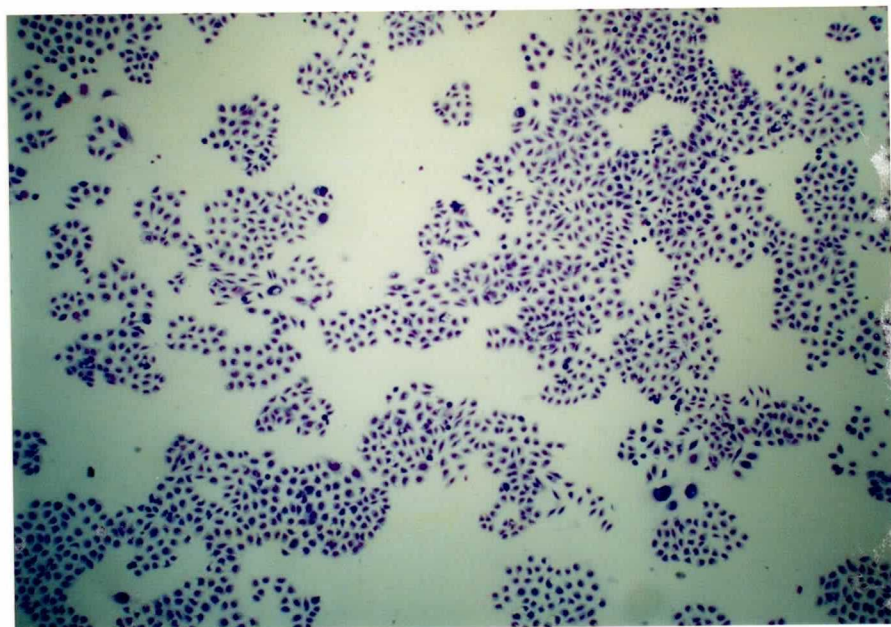


Fig. 47. 500IU PMS. $\times 10$.

Fig. 48. 100IU Prolactin. $\times 10$.



Effects of Prolactin on bovine granulosa cell development
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald giemsa
stain)

Fig. 49. Control. $\times 10$.

Fig. 50. Control. $\times 25$.

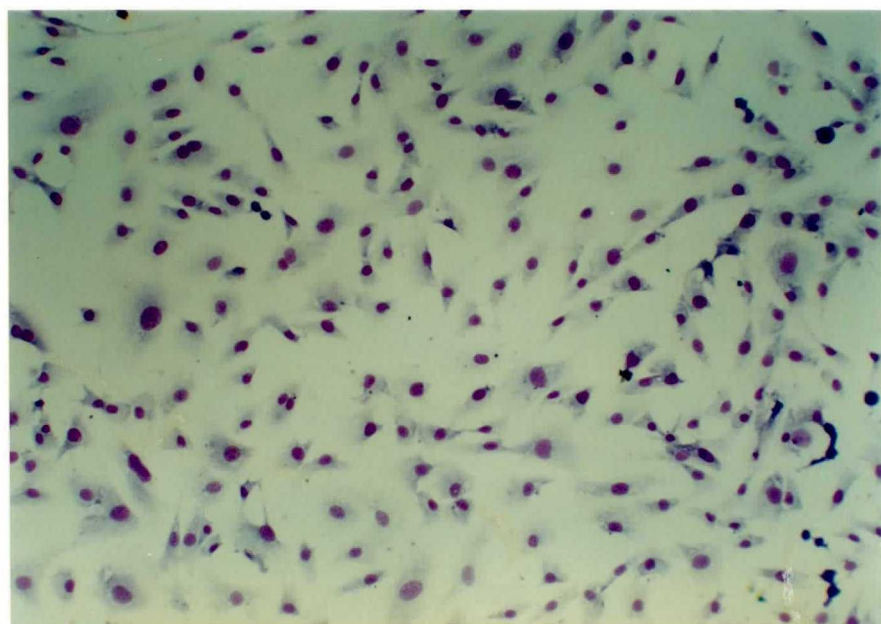
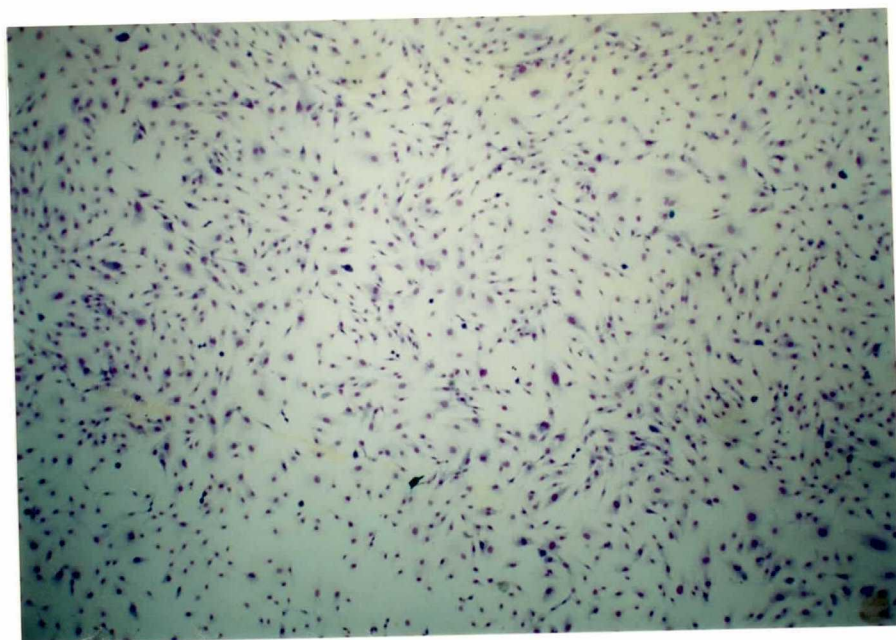


Fig. 51. 5IU Prolactin. $\times 10$.

Fig. 52. 25IU Prolactin. $\times 10$.

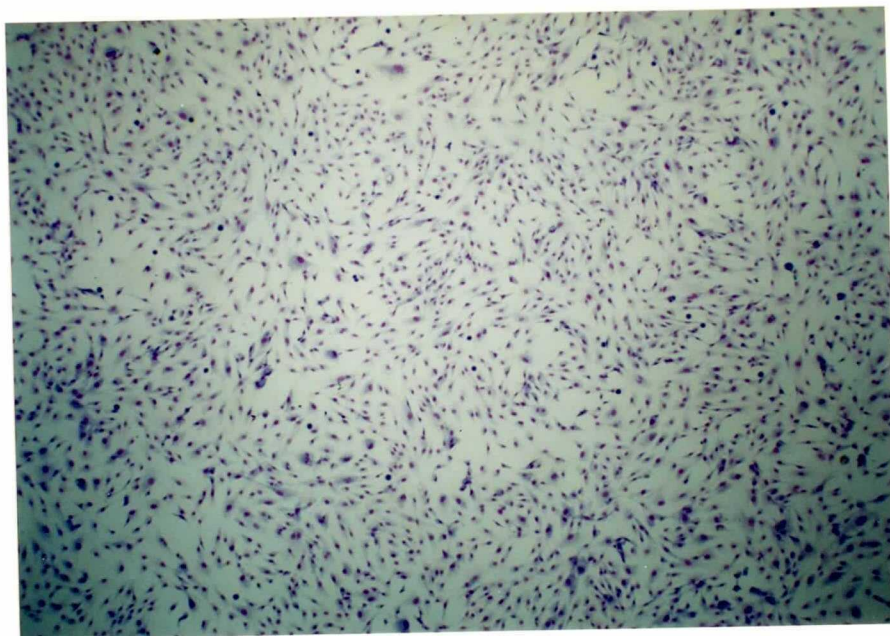
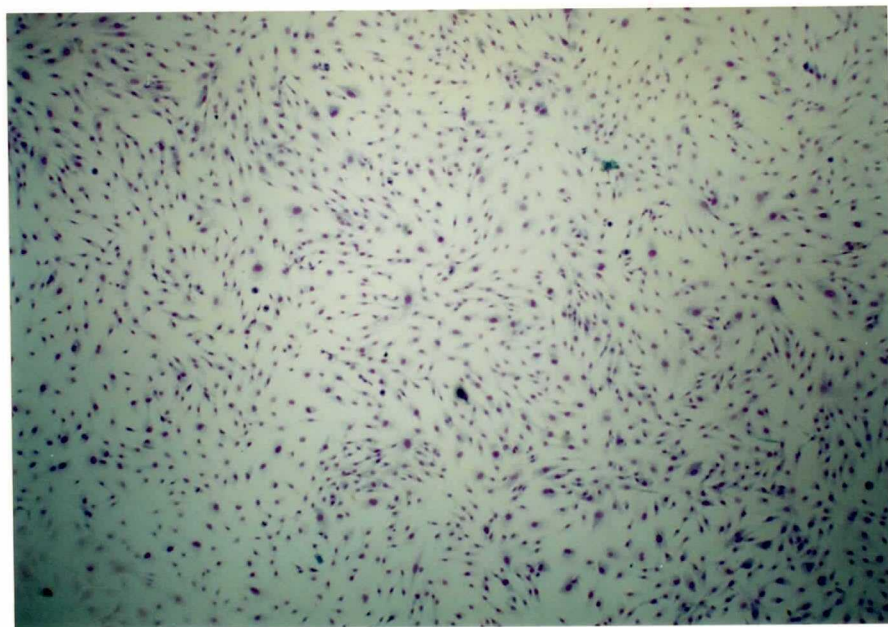


Fig. 53. 50IU Prolactin. $\times 10$.

Fig. 54. 100IU Prolactin. $\times 10$.

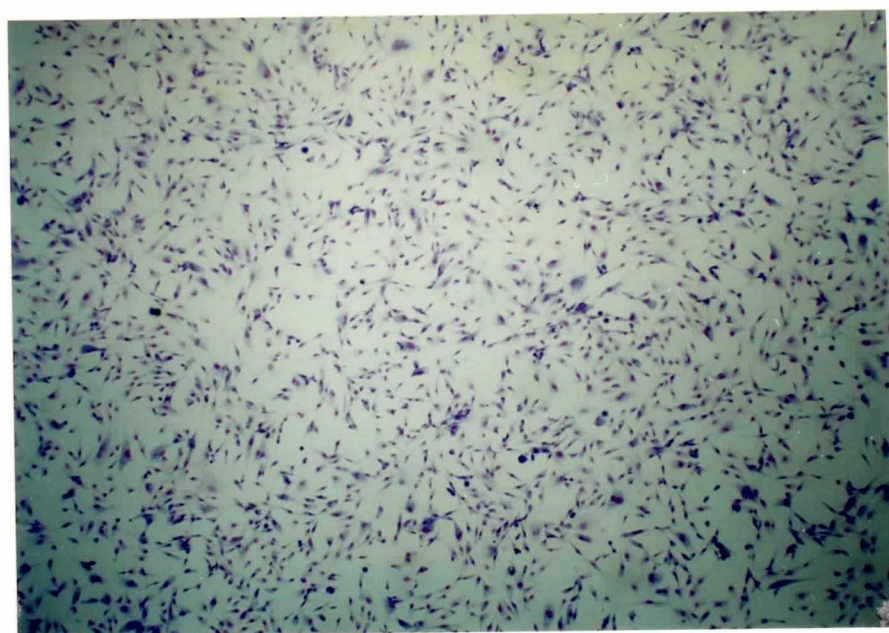
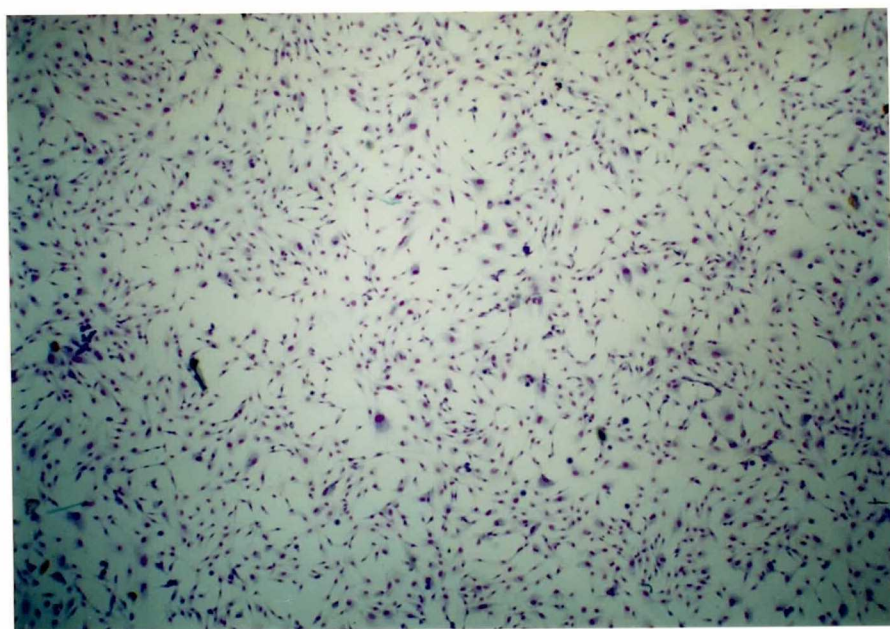
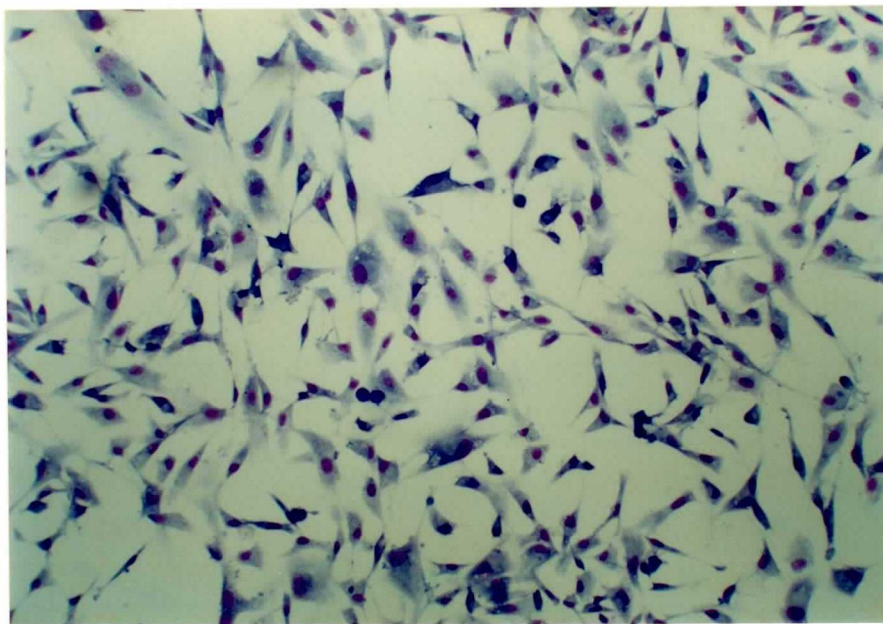
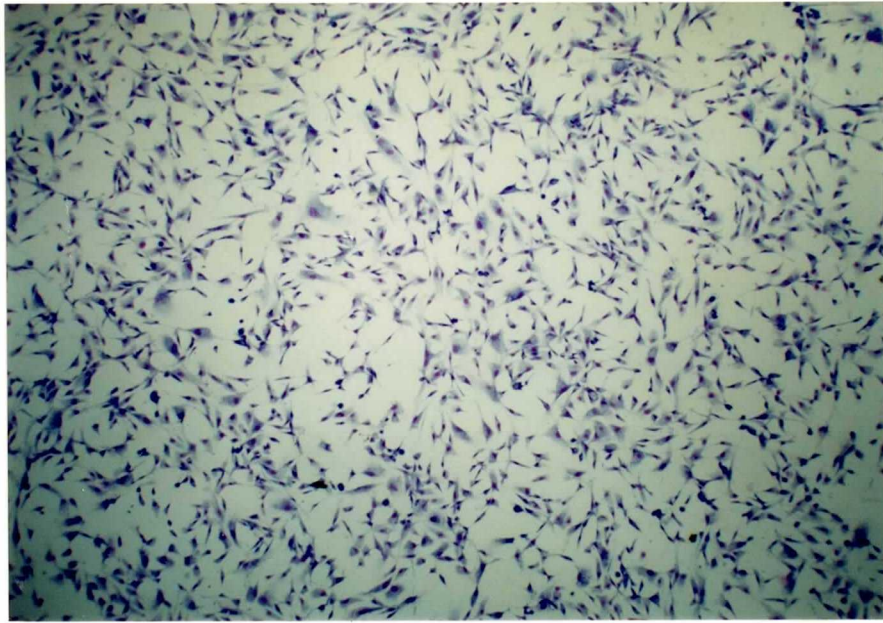


Fig. 55. 200IU prolactin. $\times 10$.

Fig. 56. 200IU prolactin. $\times 25$.



(124)
Effects of Prolactin on bovine luteal cell development
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald giemsa
stain)

Fig. 57. control. $\times 10$.

Fig. 58. Control. $\times 25$.

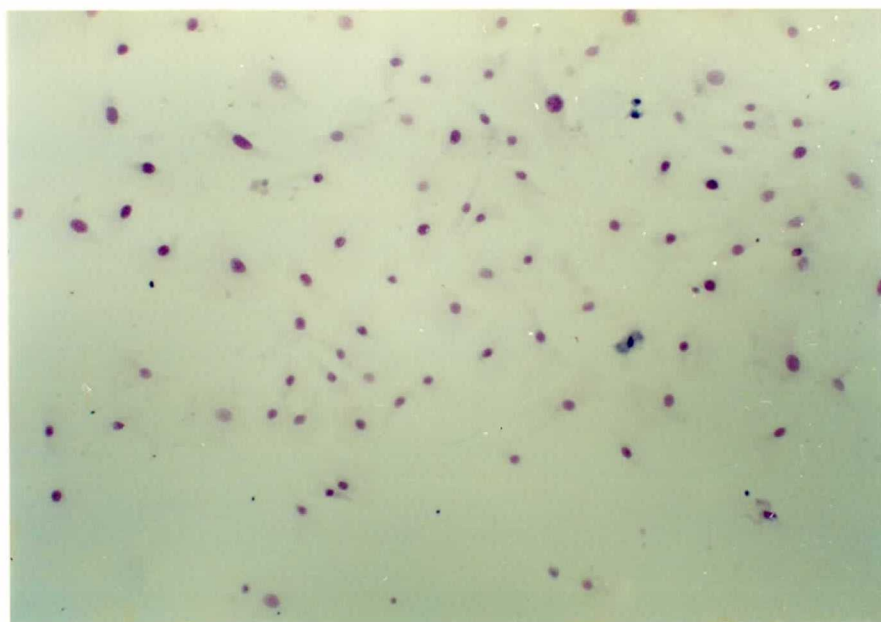
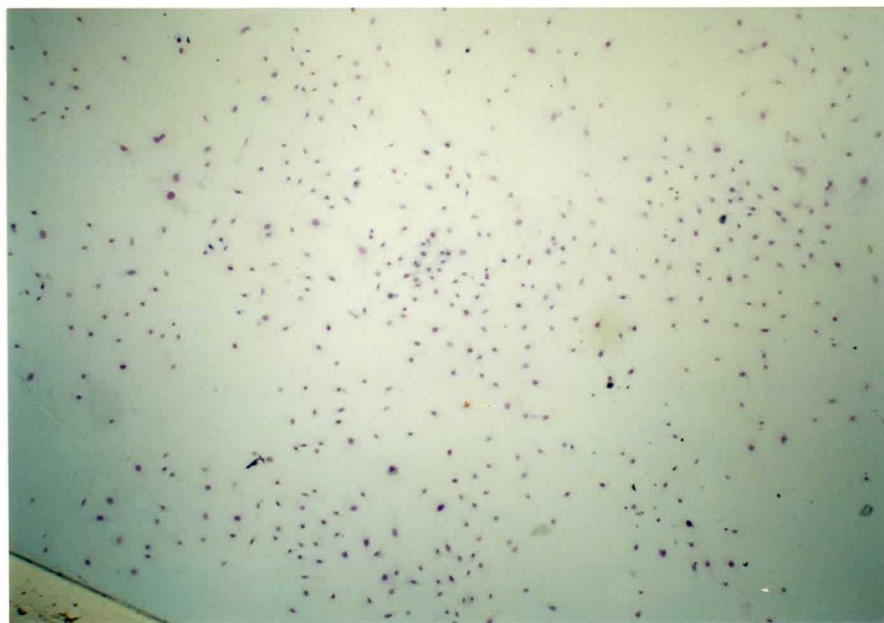


Fig. 59. 5IU prolactin. $\times 10$.

Fig. 60. 25IU Prolactin. $\times 10$.

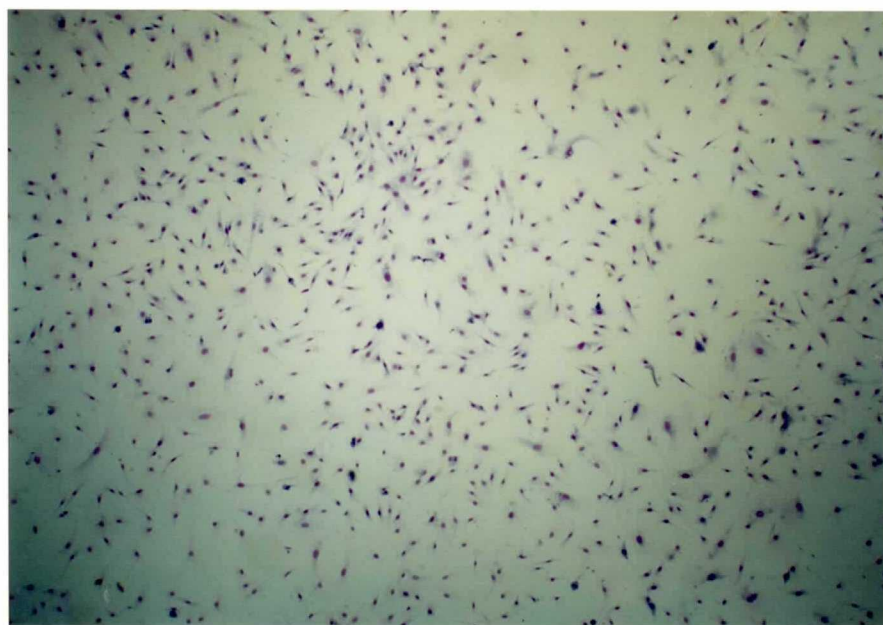
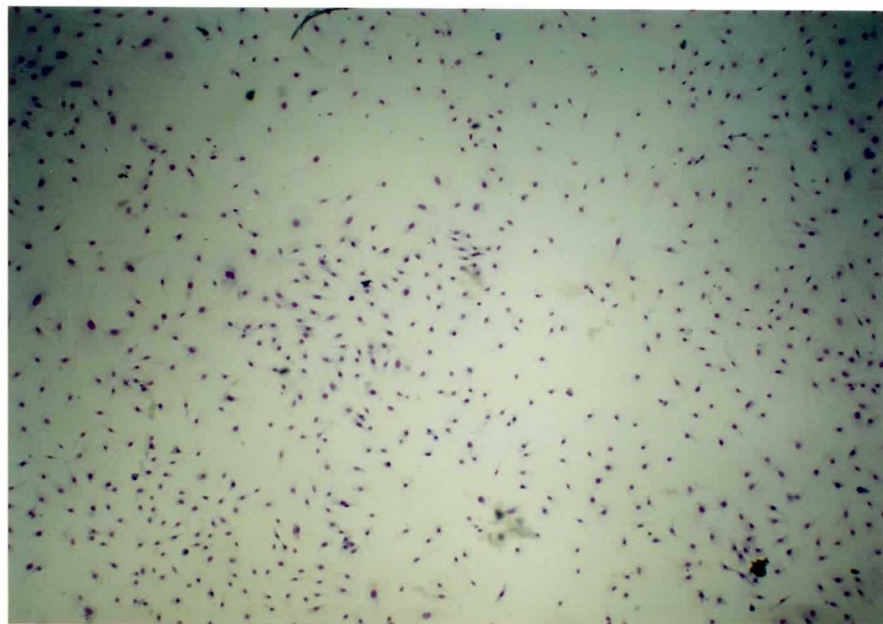


Fig. 61. 50IU Prolactin. $\times 10$.

Fig. 62. 100IU prolactin. $\times 10$.

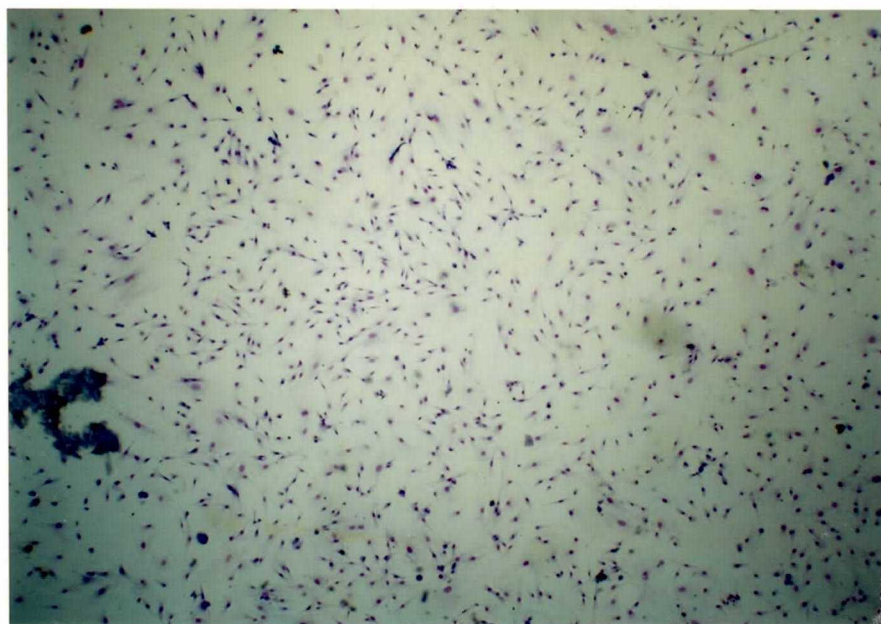
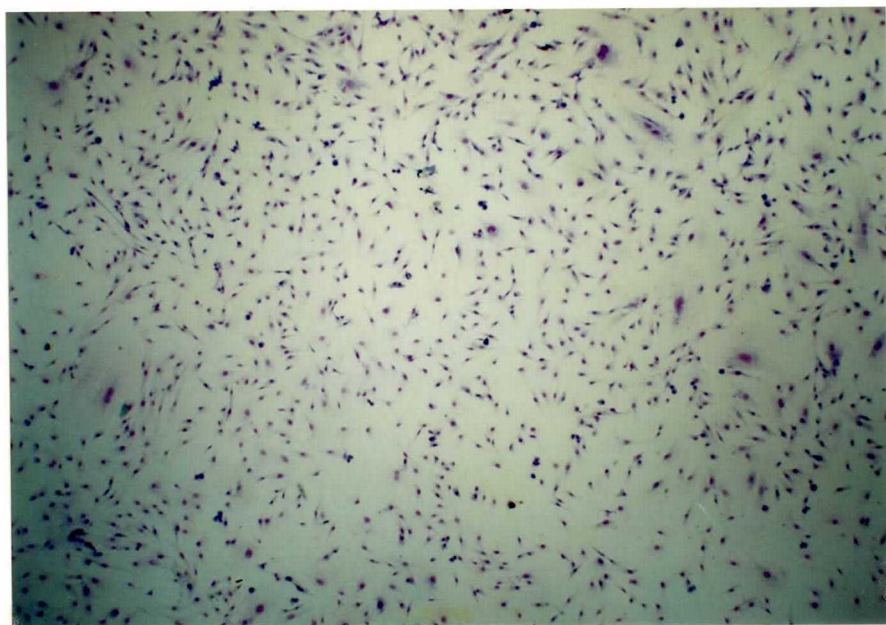
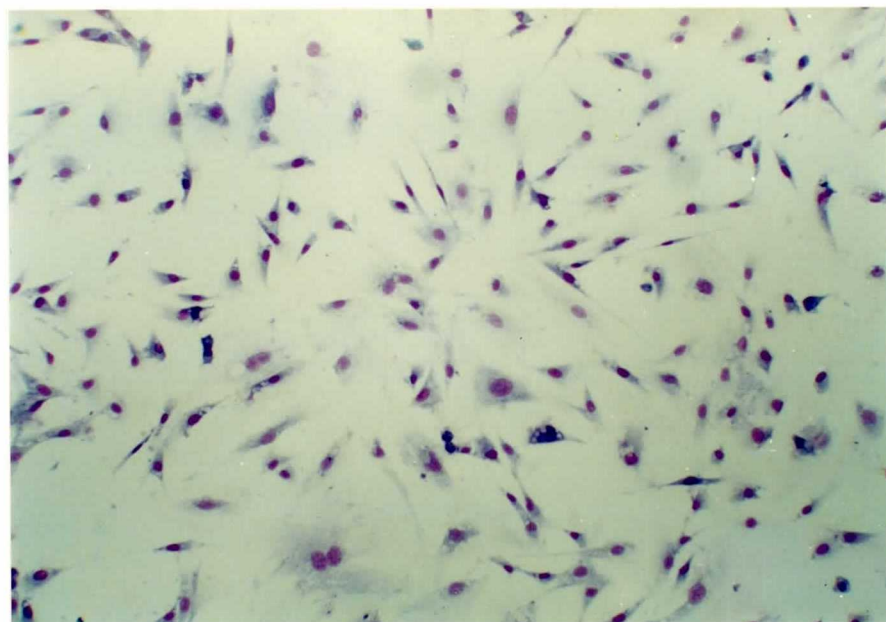
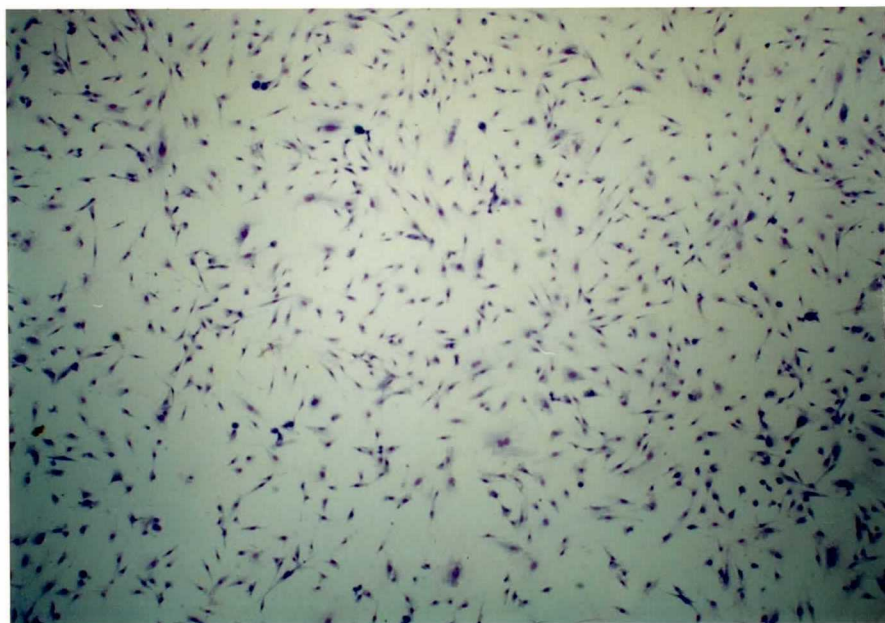


Fig. 63. 200IU Prolactin. $\times 10$.

Fig. 64. 200IU Prolactin. $\times 25$.



Effects of Prolactin on Strain Hela-s3 development
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml. medium, May-gruenwald giemsa
stain)

Fig. 65. Control. $\times 10$.

Fig. 66. Control. $\times 25$.

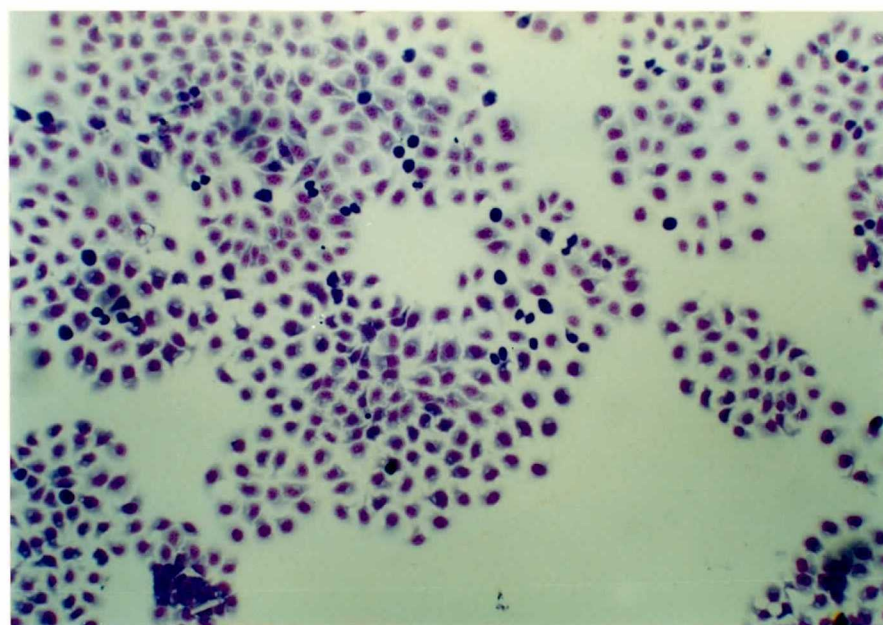
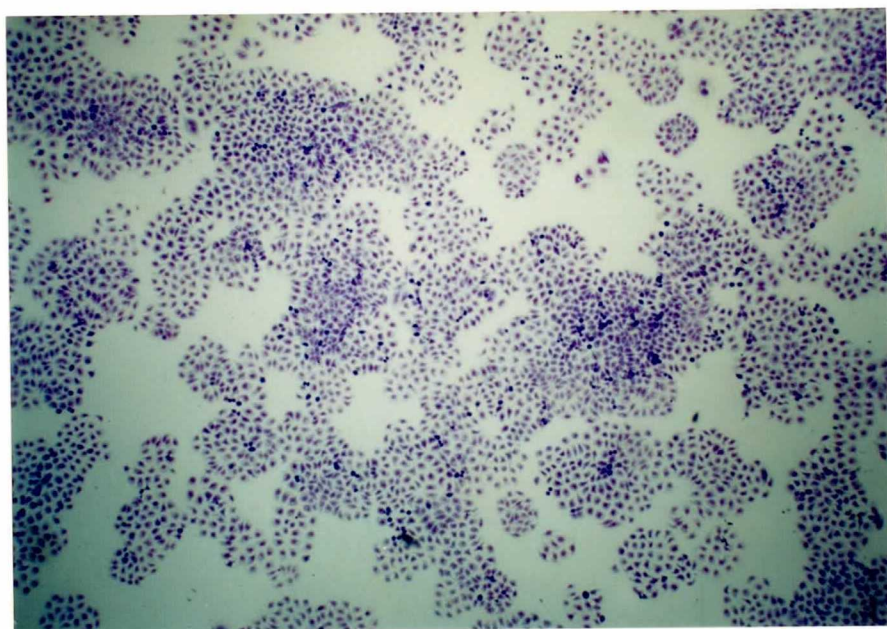


Fig. 67. 5IU Prolactin. $\times 10$.

Fig. 68. 25IU Prolactin. $\times 10$.

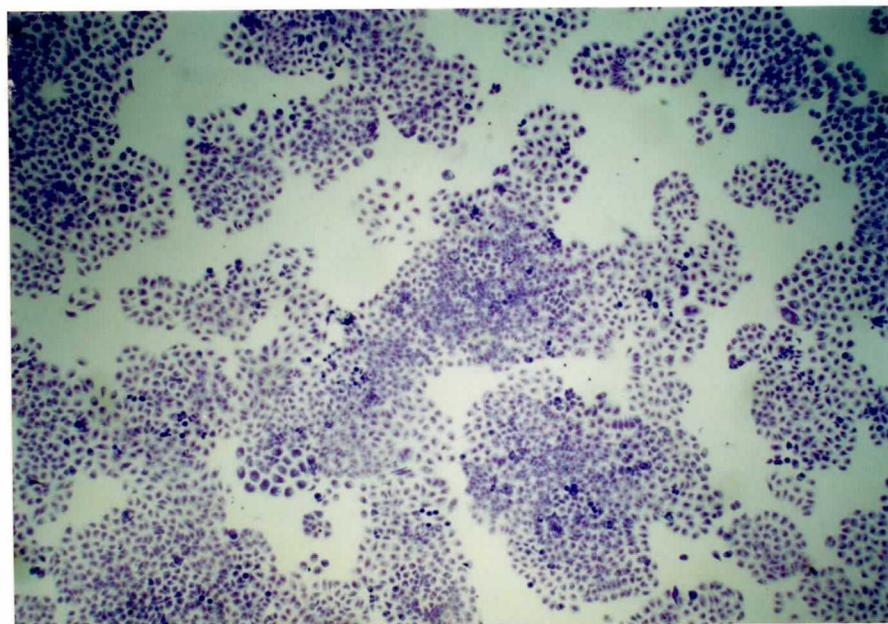
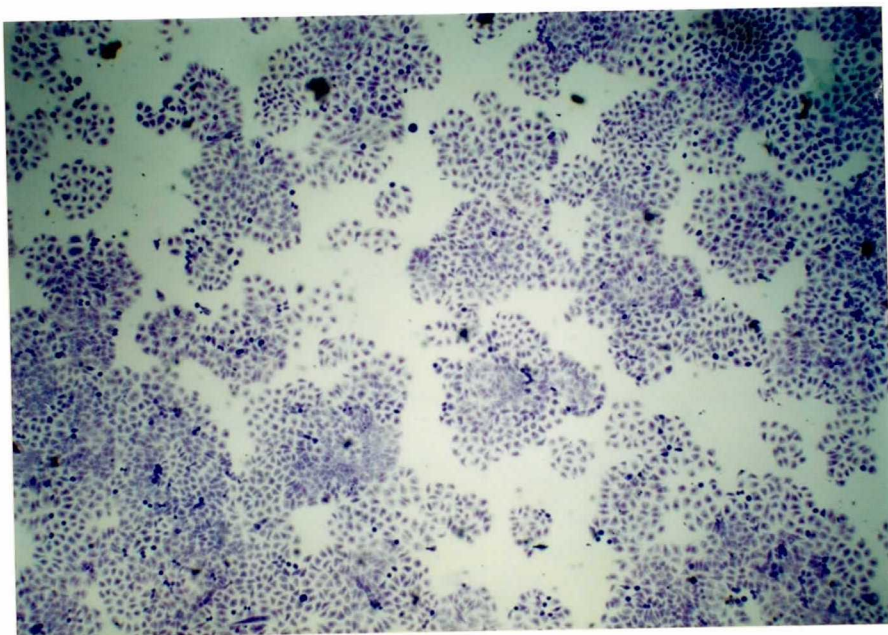


Fig. 69. 50IU Prolactin. $\times 10$.

Fig. 70. 100IU Prolactin. $\times 10$.

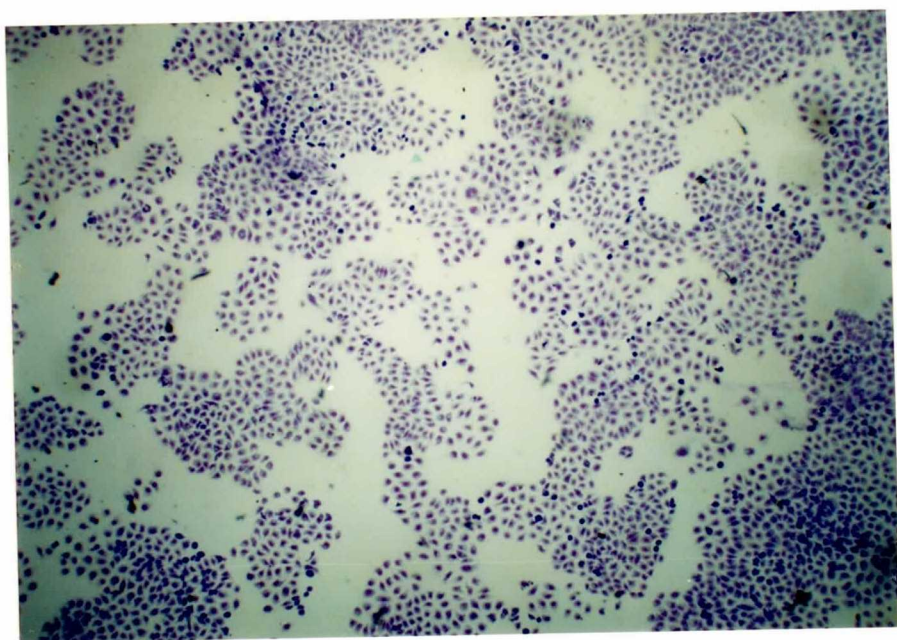
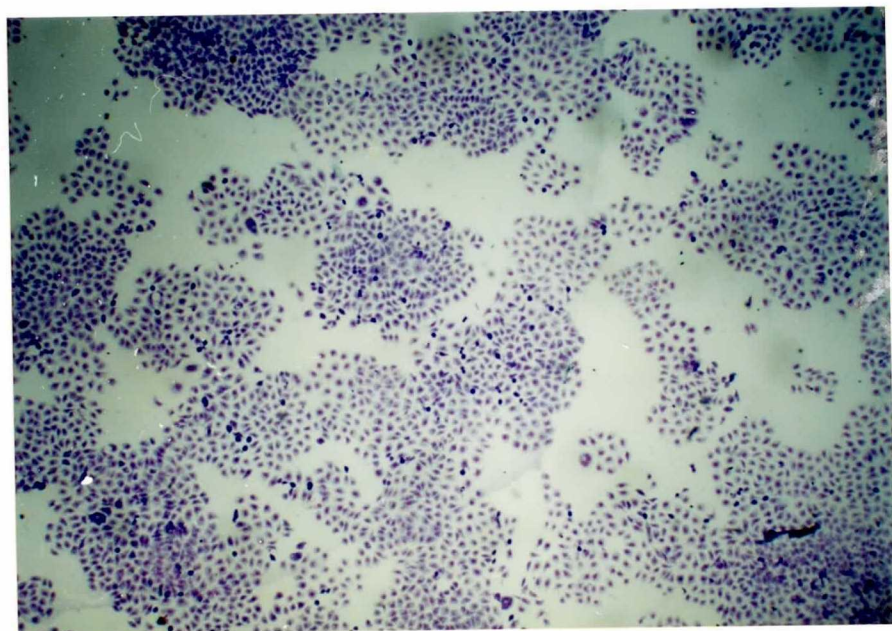
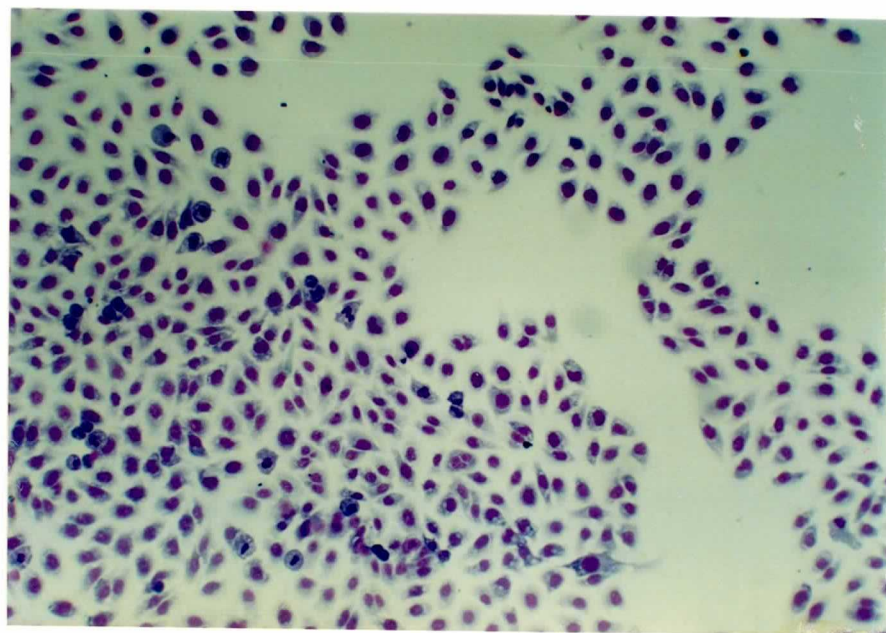
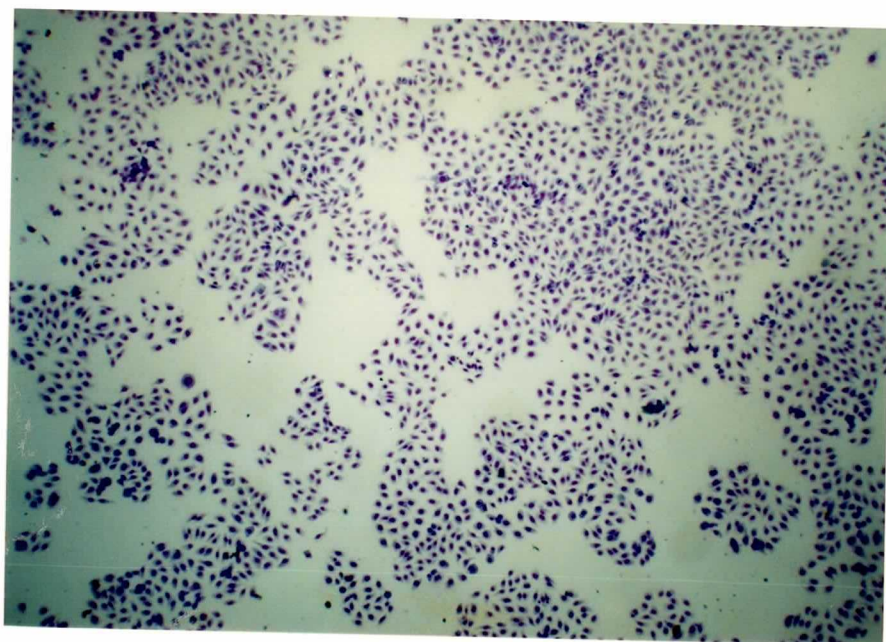


Fig. 71. 200IU Prolactin. $\times 10$.

Fig. 72. 200IU Proractin. $\times 25$.



Effects of LH on bovine granulosa cell development
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald giemsa
stain)

Fig. 73. Control. $\times 10$.

Fig. 74. Control. $\times 25$.

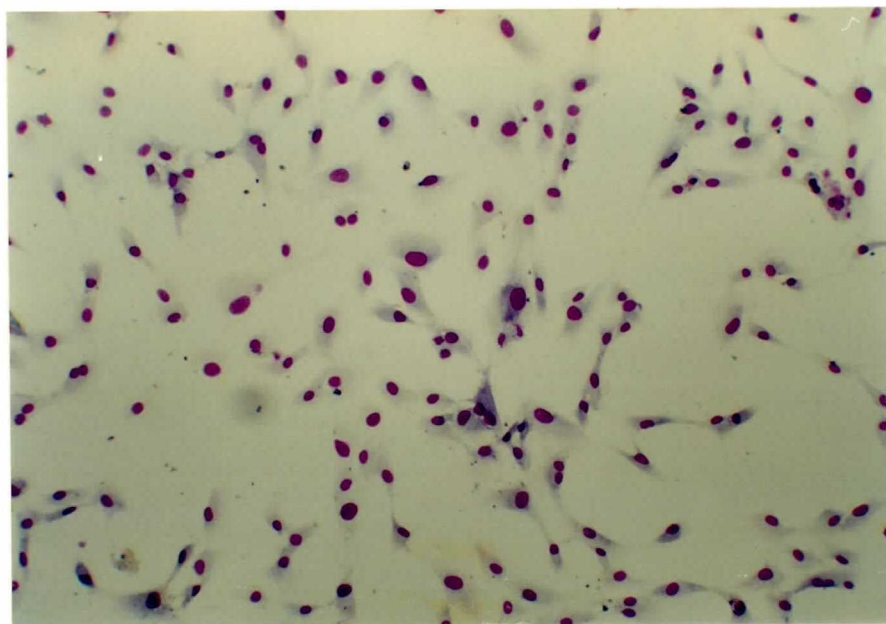
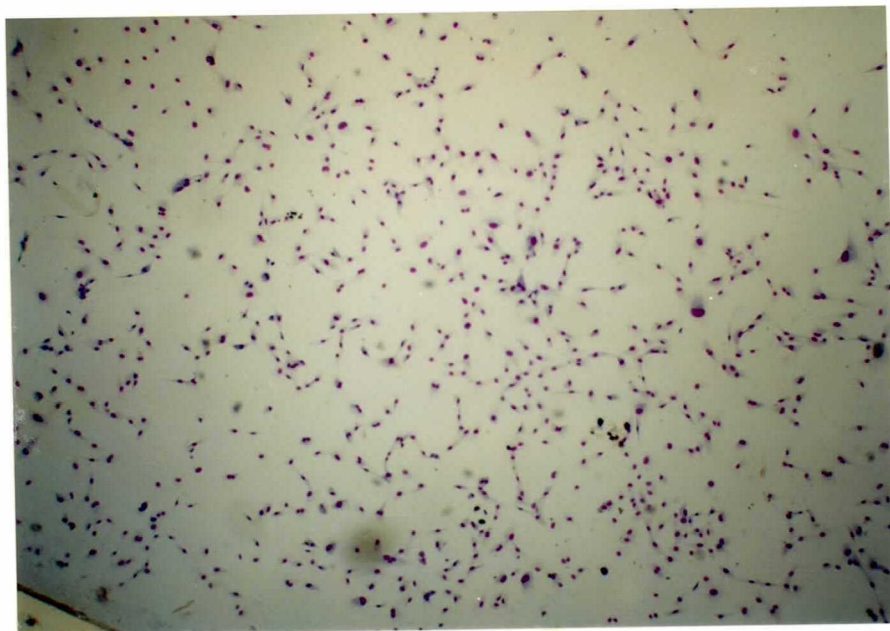


Fig. 75. $1\mu\text{g}$ LH. $\times 10$.

Fig. 76. $5\mu\text{g}$ LH. $\times 10$.

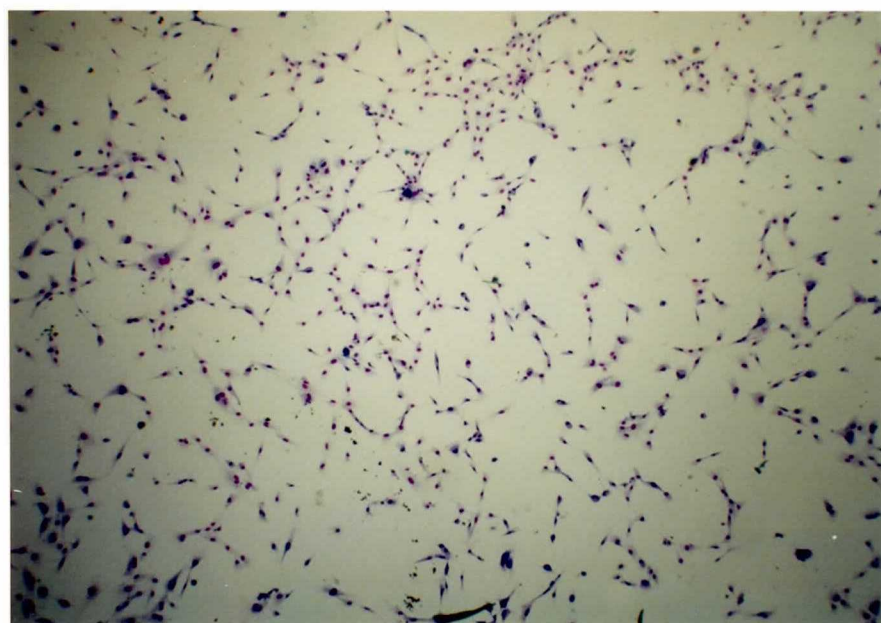
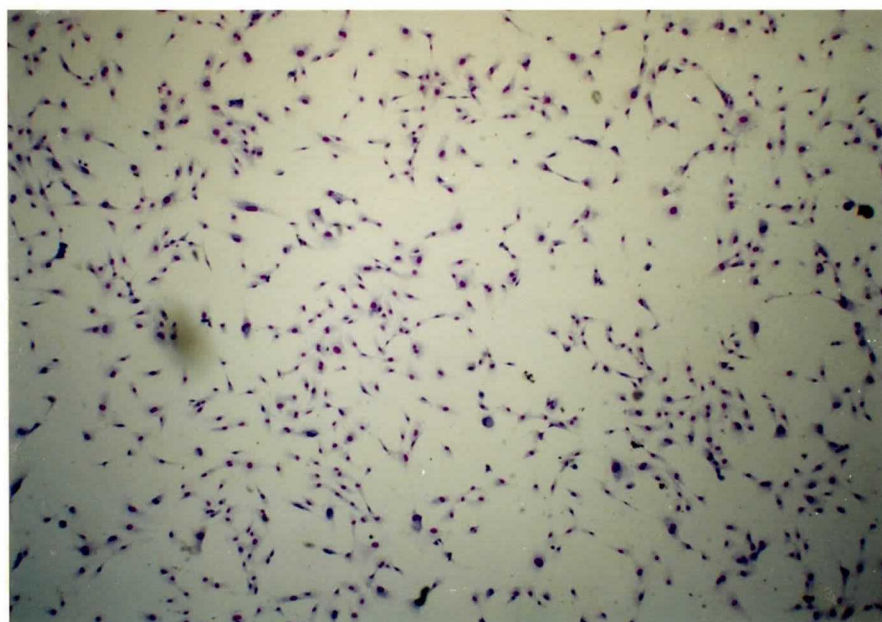


Fig. 77. $10\mu\text{g}$ LH. $\times 10$.

Fig. 78. $50\mu\text{g}$ LH. $\times 10$.

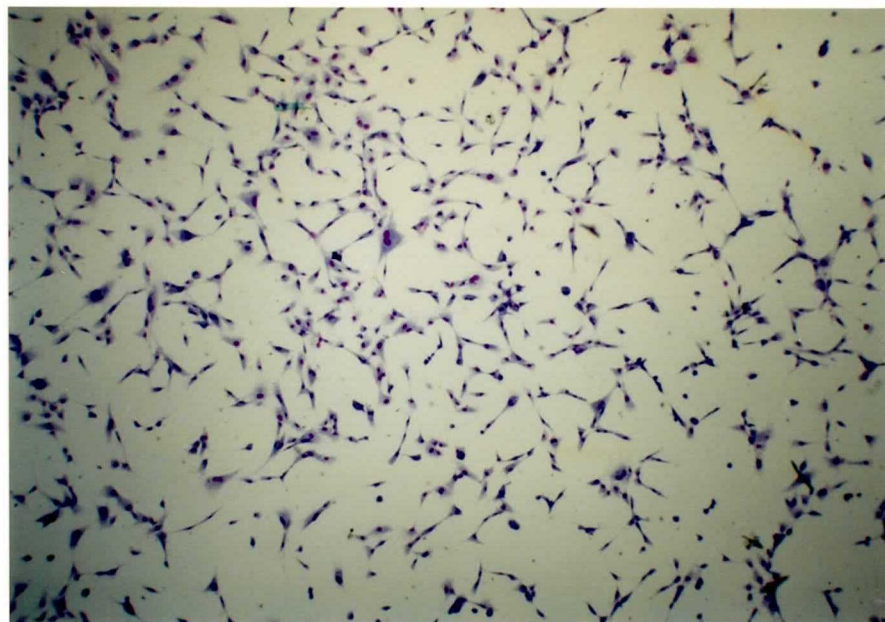
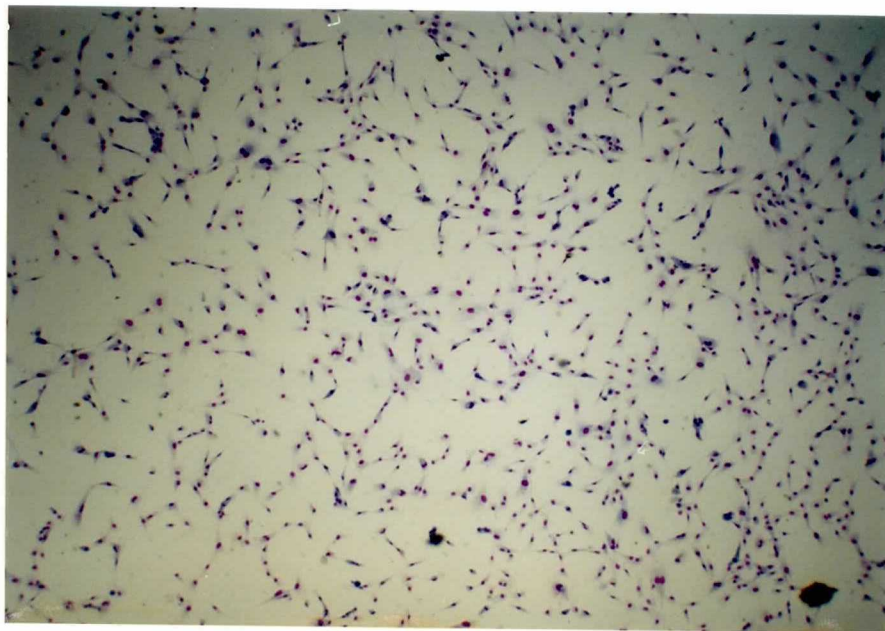


Fig. 79. 100 μ g LH. $\times 10$.

Fig. 80. 250 μ g LH. $\times 10$.

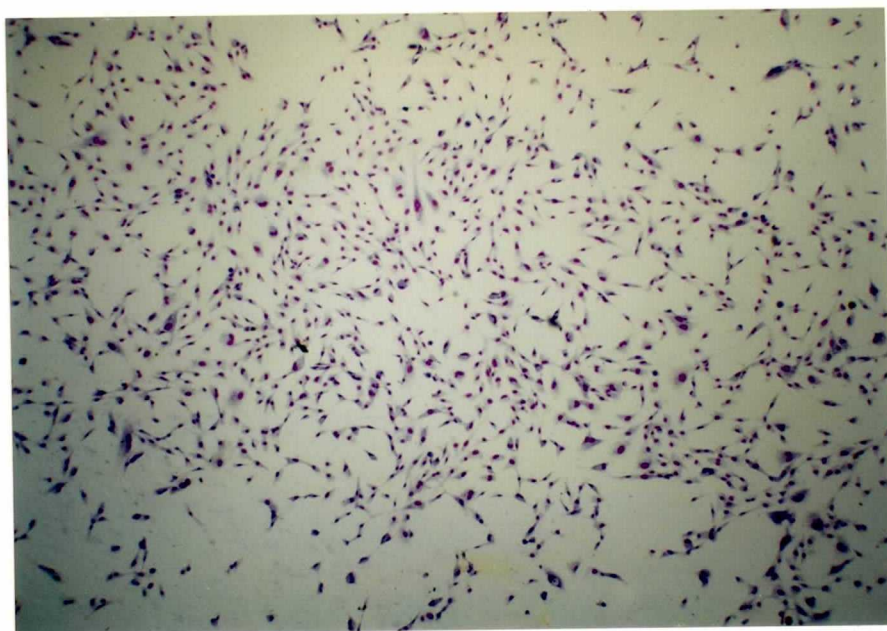
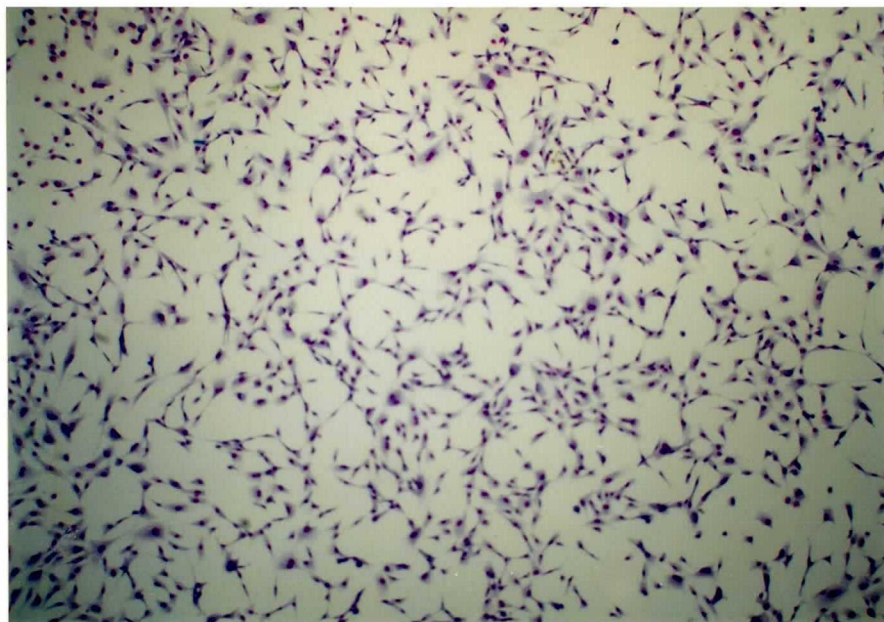


Fig. 81. 2500 μ g LH. $\times 10$.

Fig. 82. 5000 μ g LH. $\times 10$.

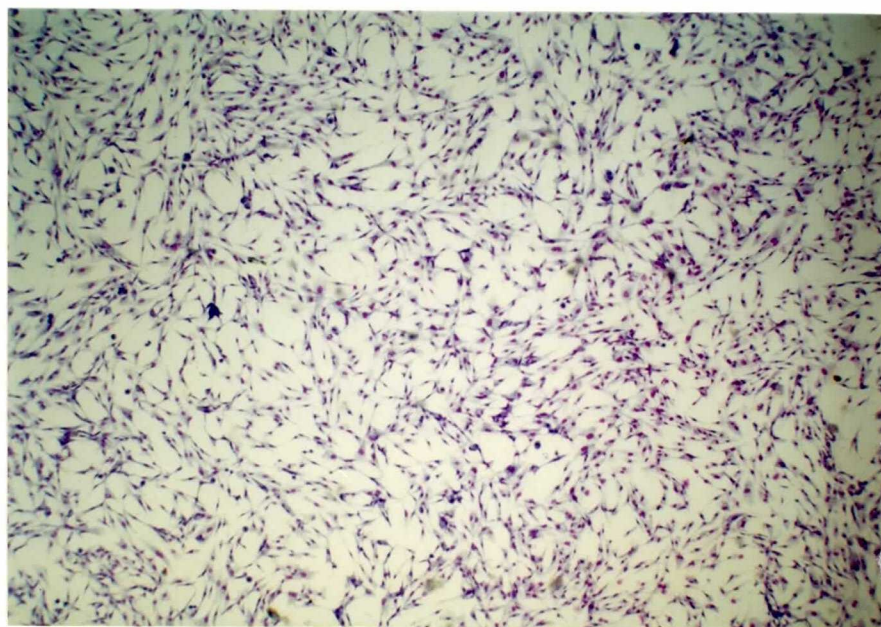
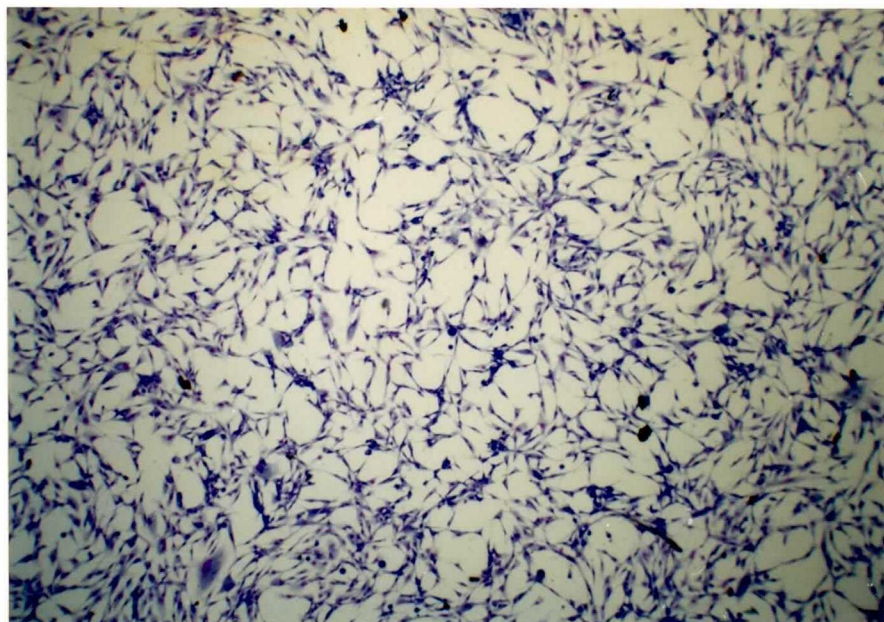
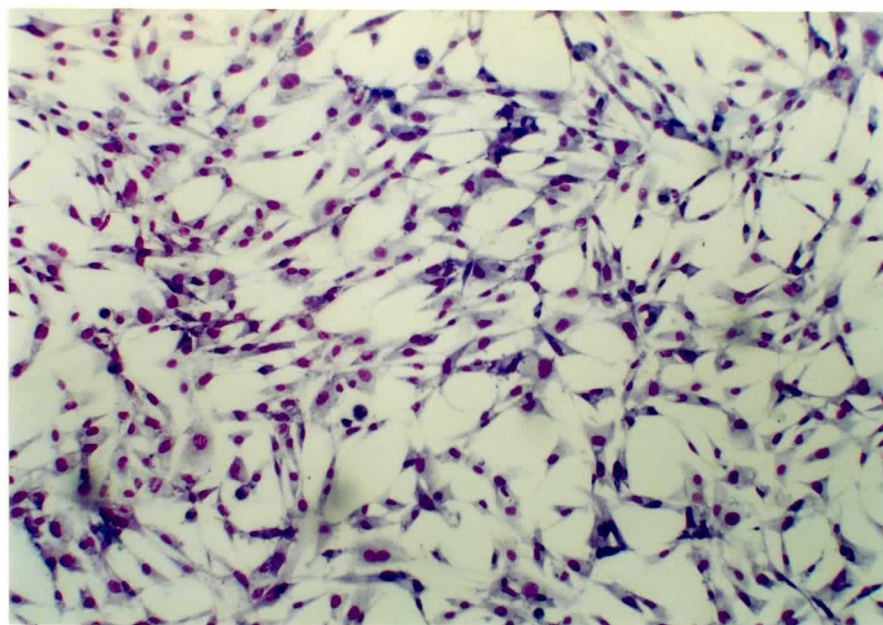


Fig. 83. 5000 μ g LH. $\times 25$.



Effects of LH on bovine luteal cell development
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald
giemsa stain)

Fig. 84. Control. $\times 10$.

Fig. 85. Control. $\times 25$.

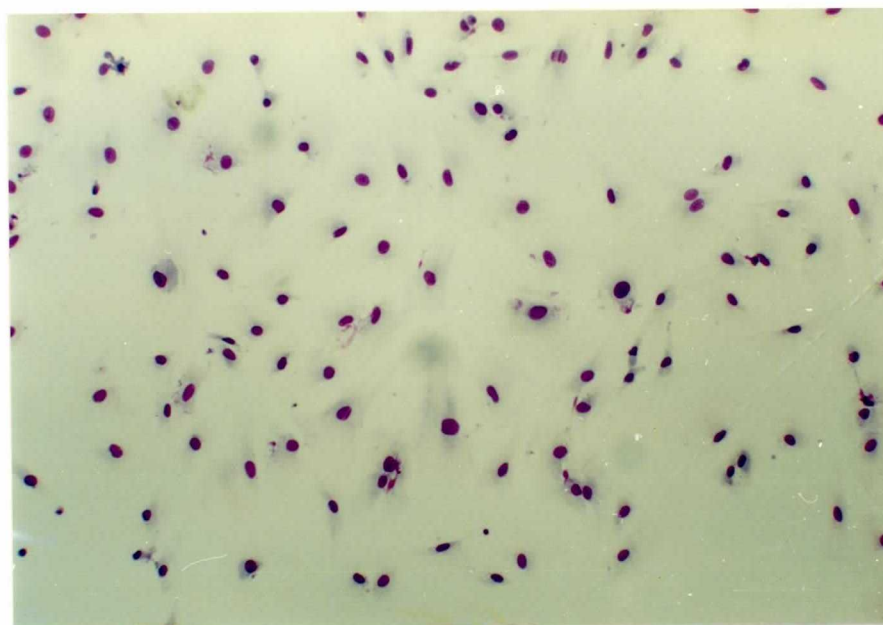
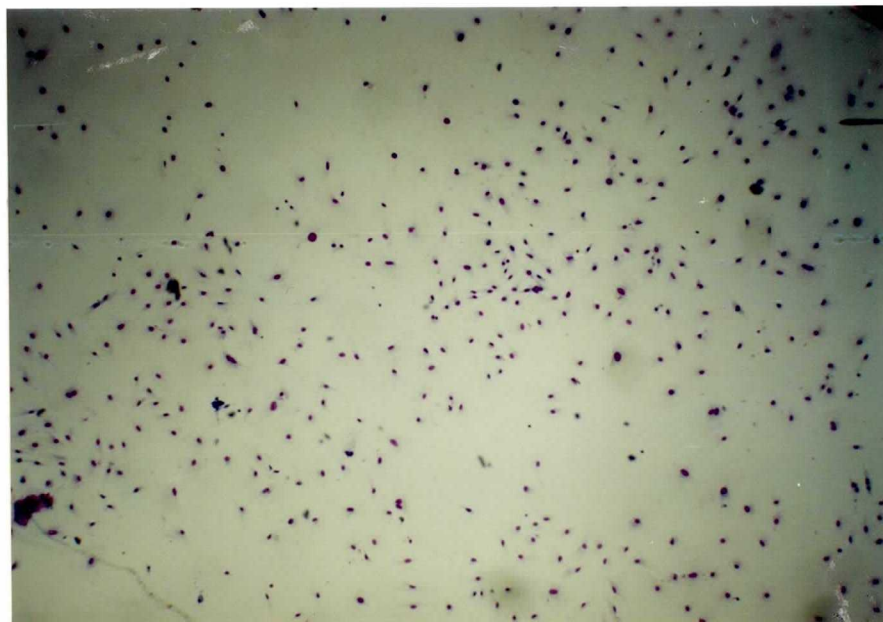


Fig. 86. $1\mu\text{g}$ LH. $\times 10$.

Fig. 87. $5\mu\text{g}$ LH. $\times 10$.

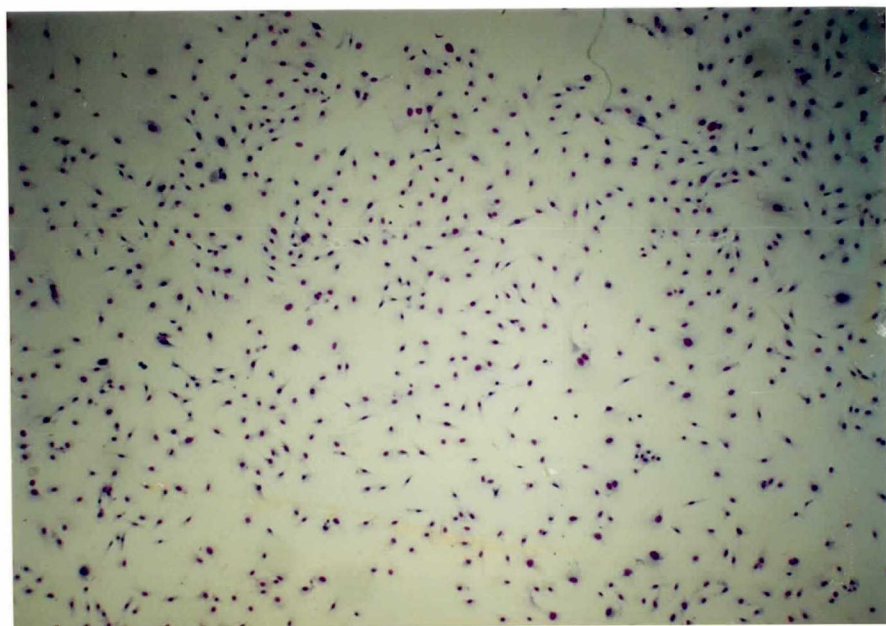


Fig. 88. 10 μ g LH. $\times 10$.

Fig. 89. 50 μ g LH. $\times 10$.

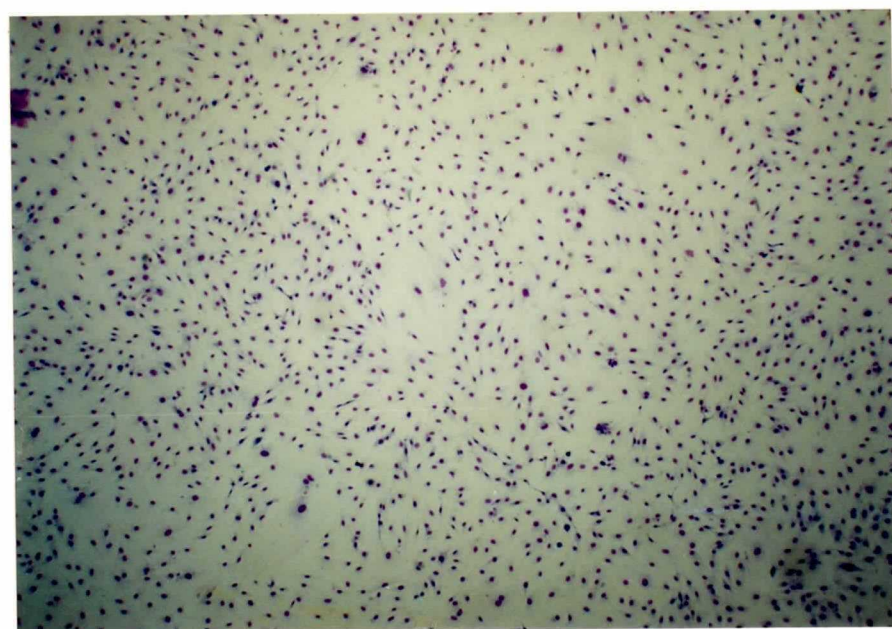
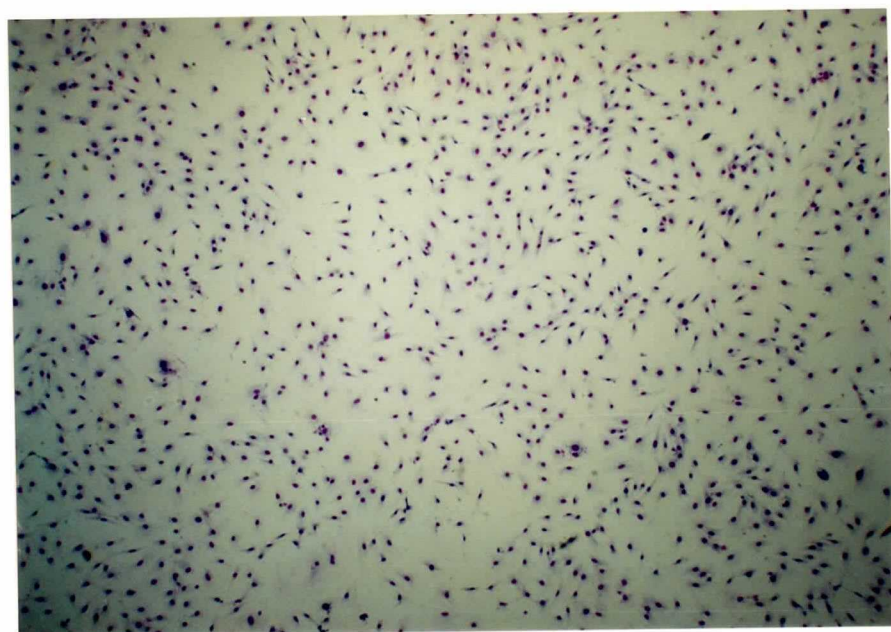


Fig. 90. 100 μ g LH. $\times 10$.

Fig. 91. 250 μ g LH. $\times 10$.

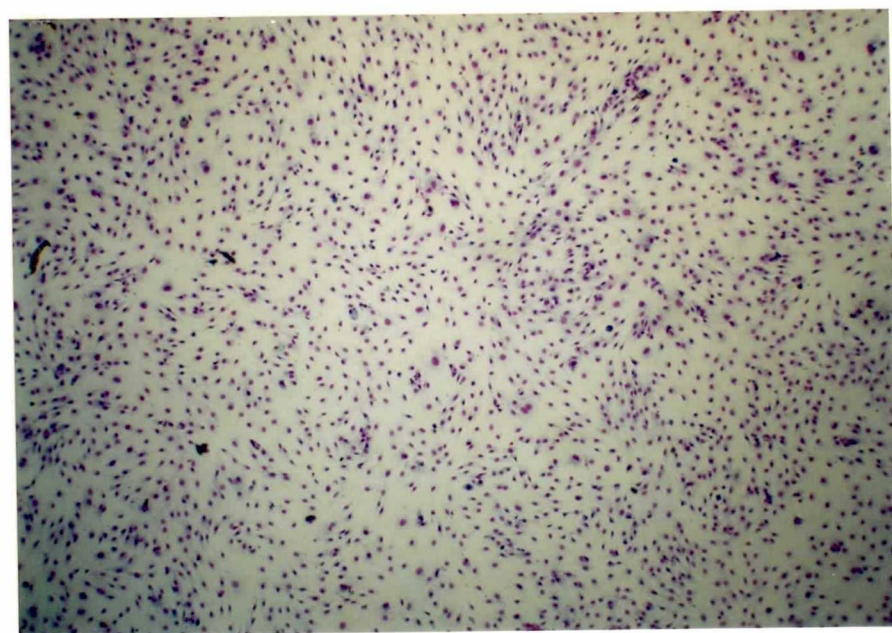
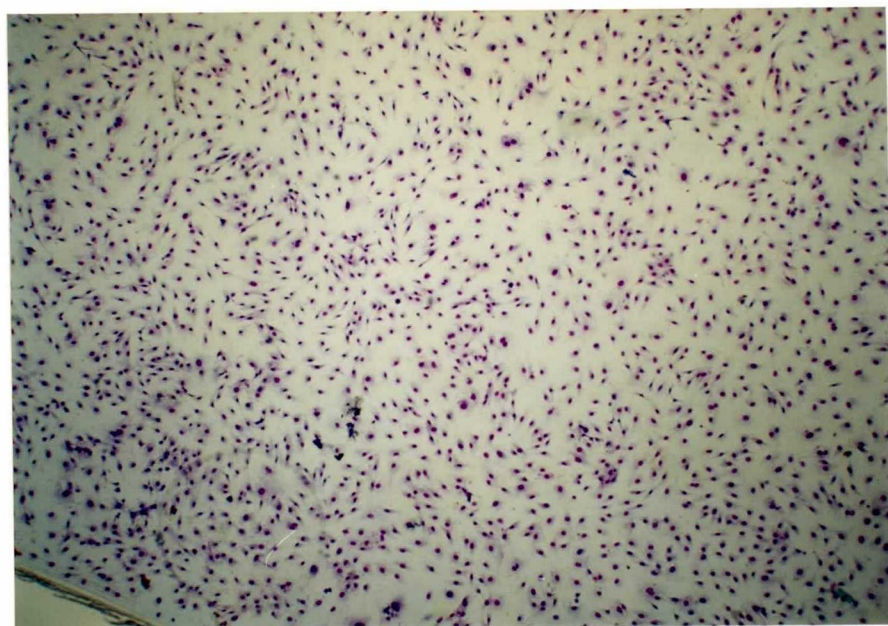


Fig. 92. 500 μ g LH. $\times 10$.

Fig. 93. 1000 μ g LH. $\times 10$.

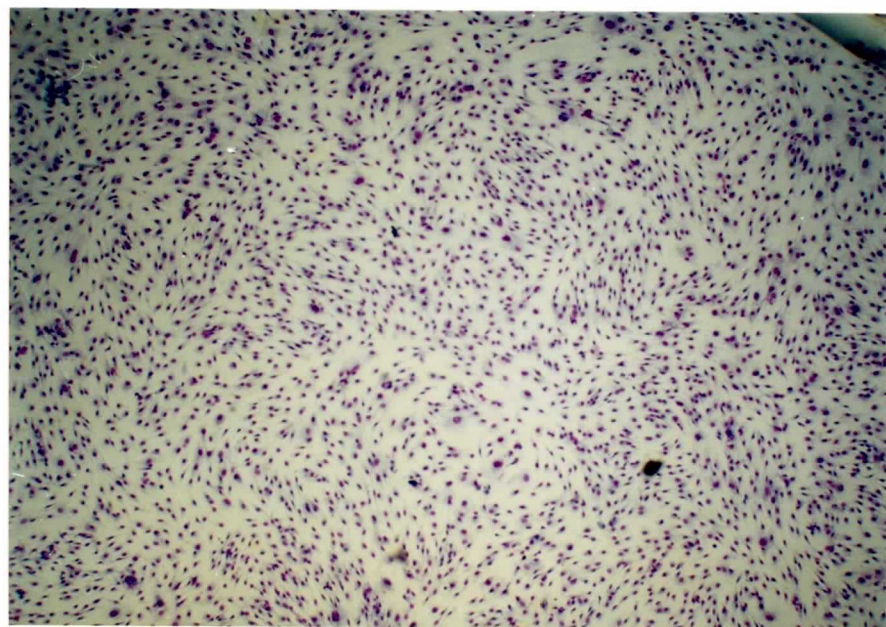
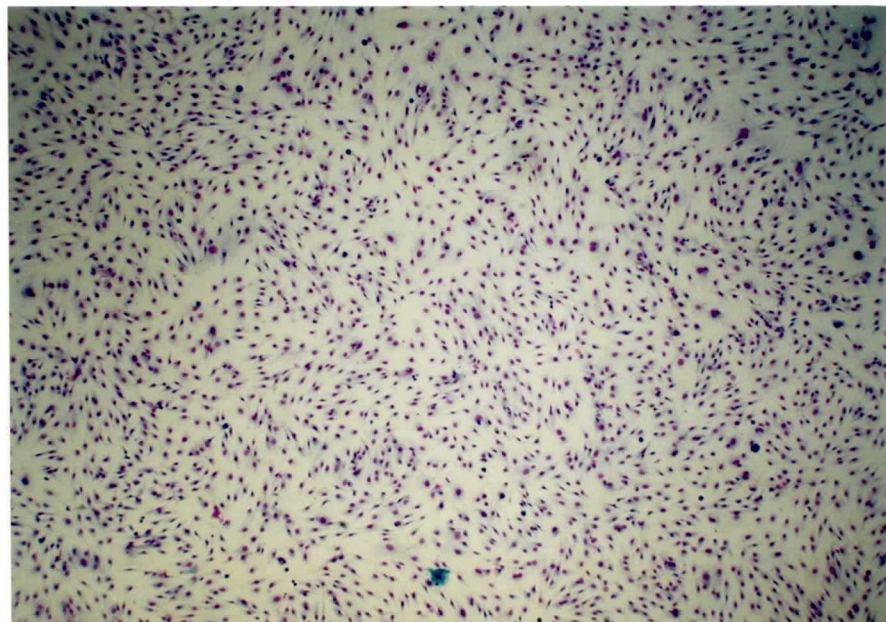


Fig. 94. 2500 μ g LH. $\times 10$.

Fig. 95. 5000 μ g LH. $\times 10$.

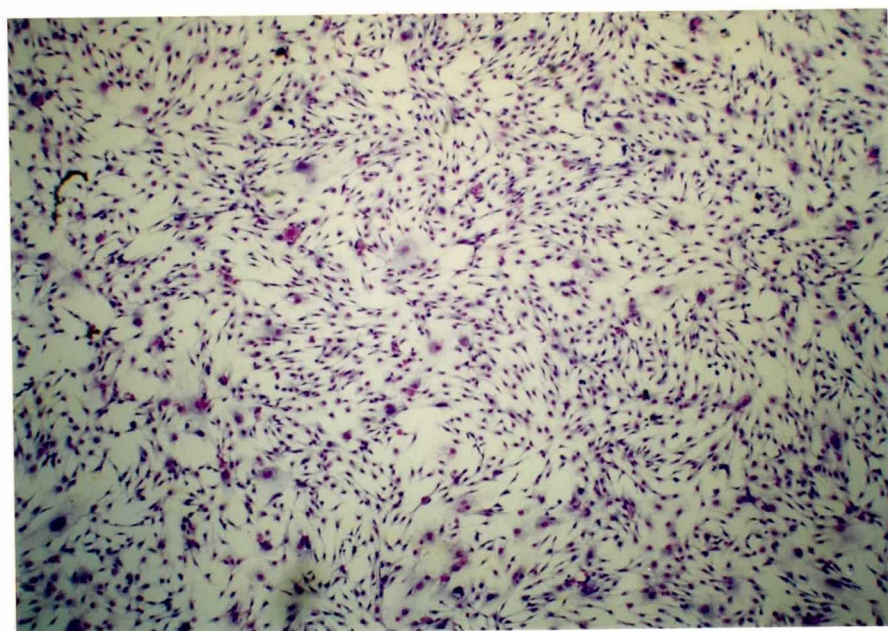
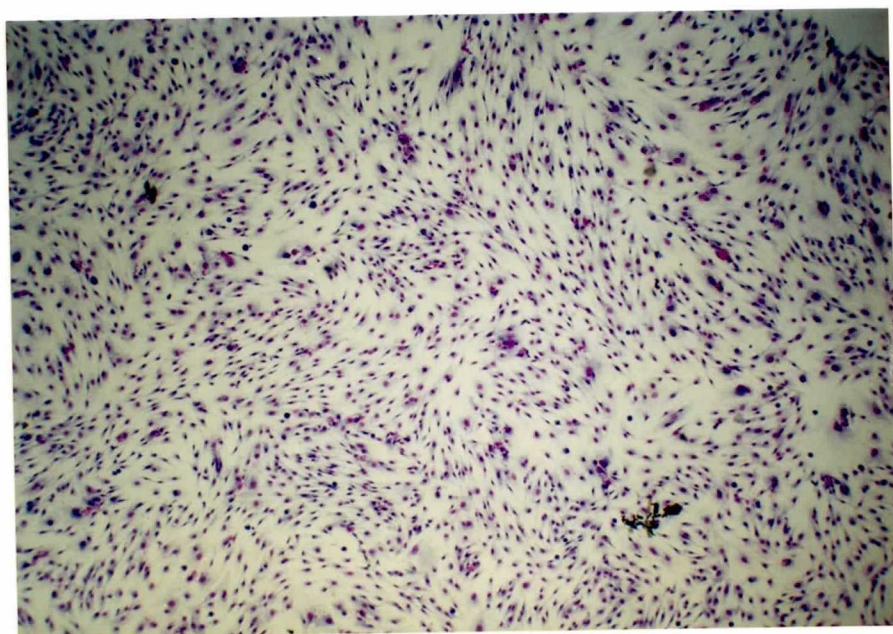
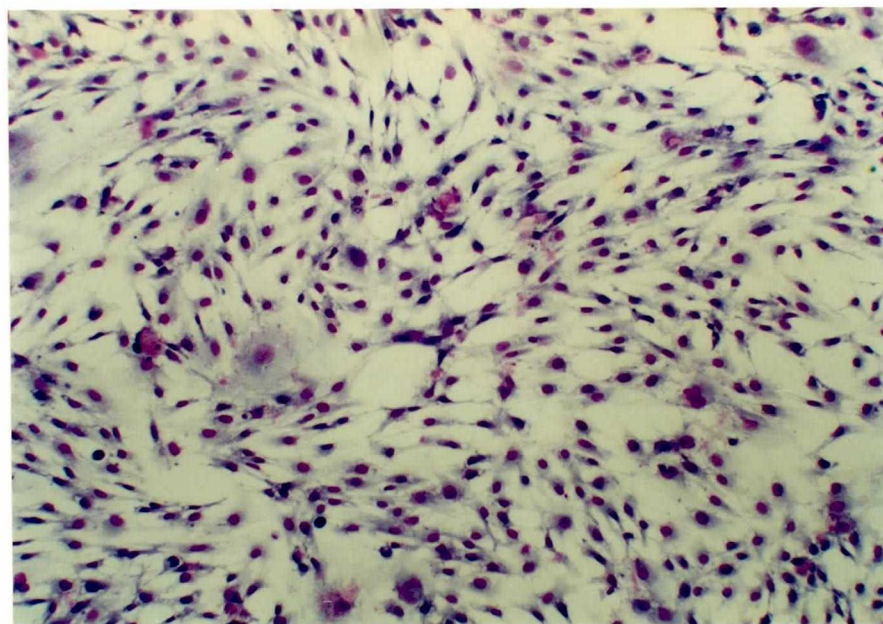


Fig. 96. 5000 μ g LH. $\times 25$.



Effects of FSH on bovine granulosa cell development
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald
giemsa stain)

Fig. 97. Control. $\times 10$.

Fig. 98. Control. $\times 25$.

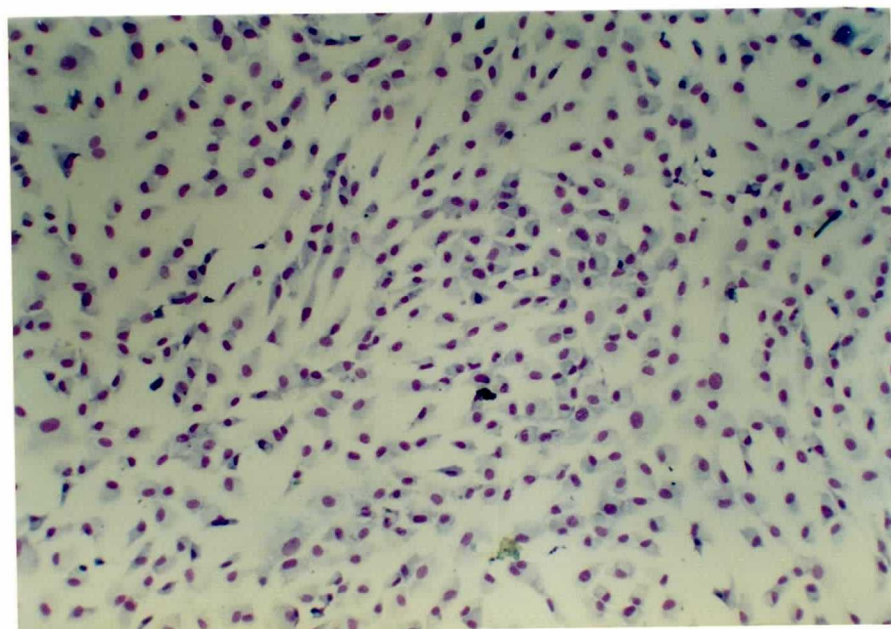
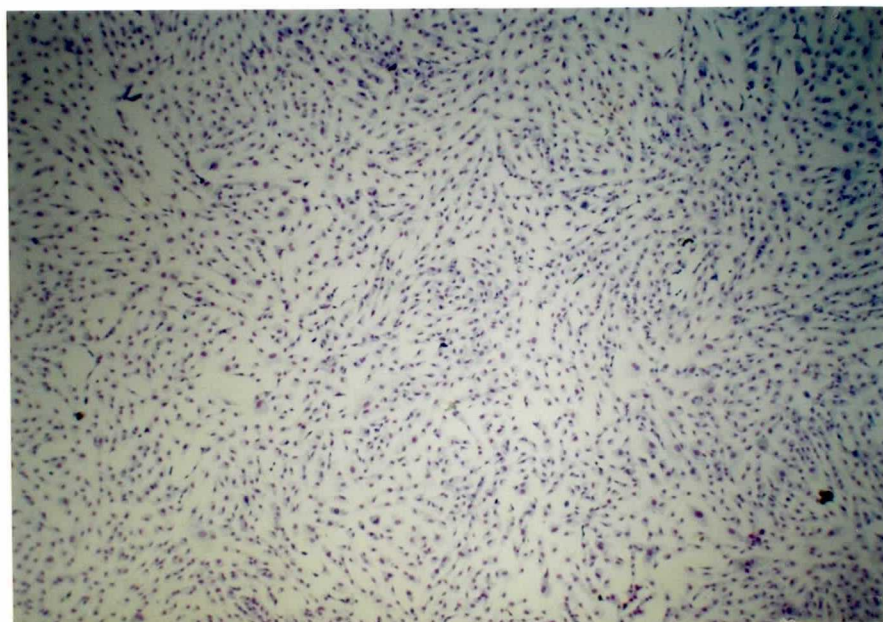
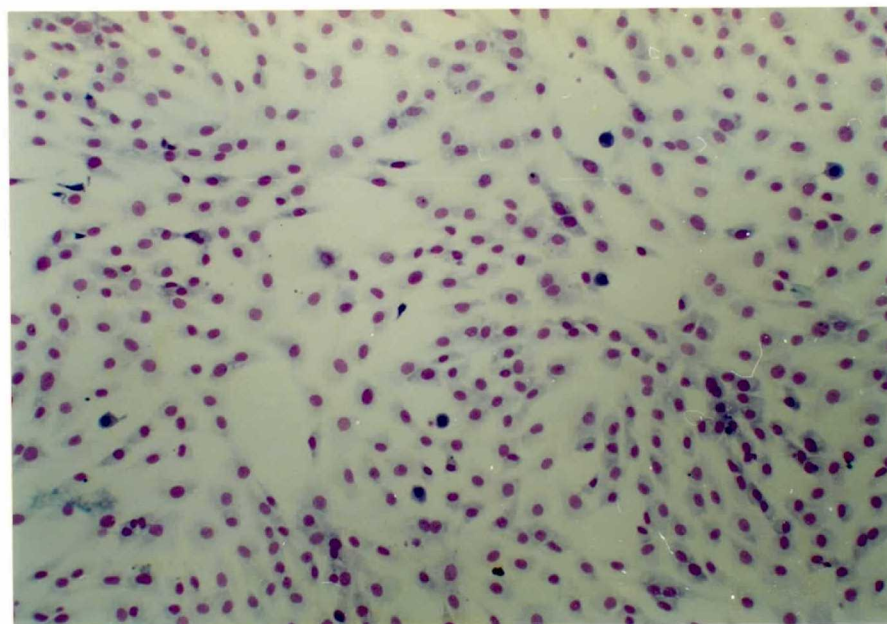
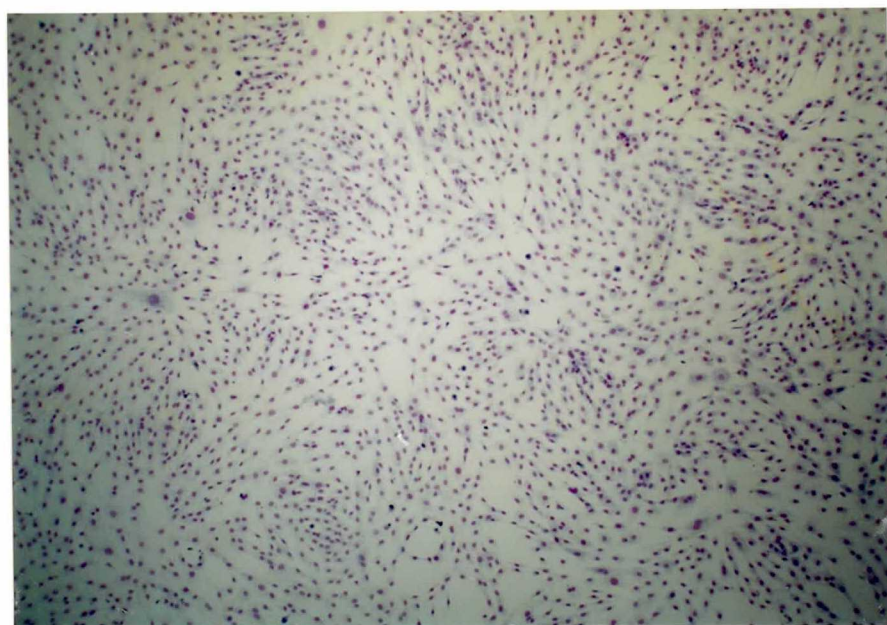


Fig. 99. 5000 μ g FSH. $\times 10$.

Fig. 100. 5000 μ g FSH. $\times 25$.



Effects of FSH on bovine luteal cell development
of tertiary culture generation.

(Inoculated 10^5 cells/5ml medium, May-gruenwald
giemsa stain)

Fig. 101. Control. $\times 10$.

Fig. 102. Control. $\times 25$.

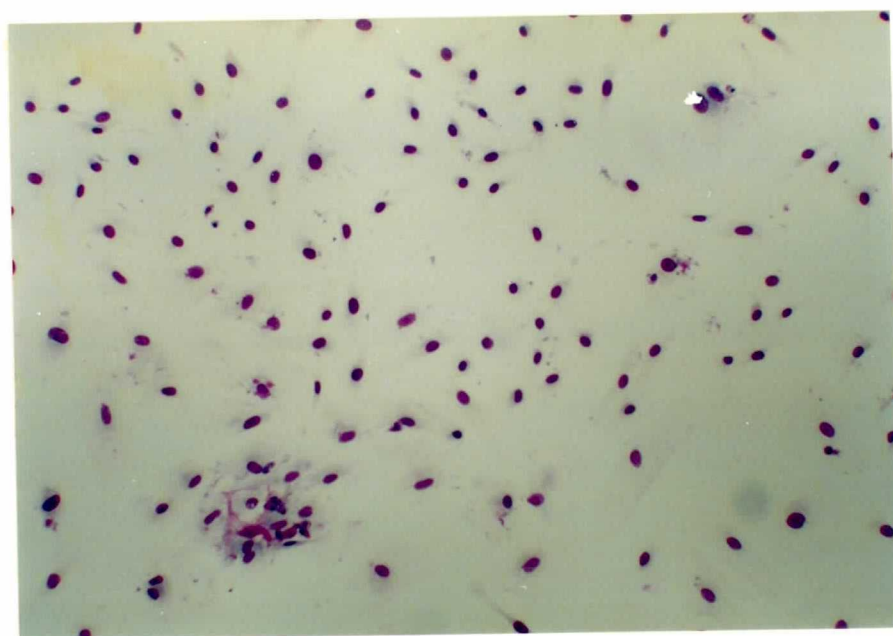
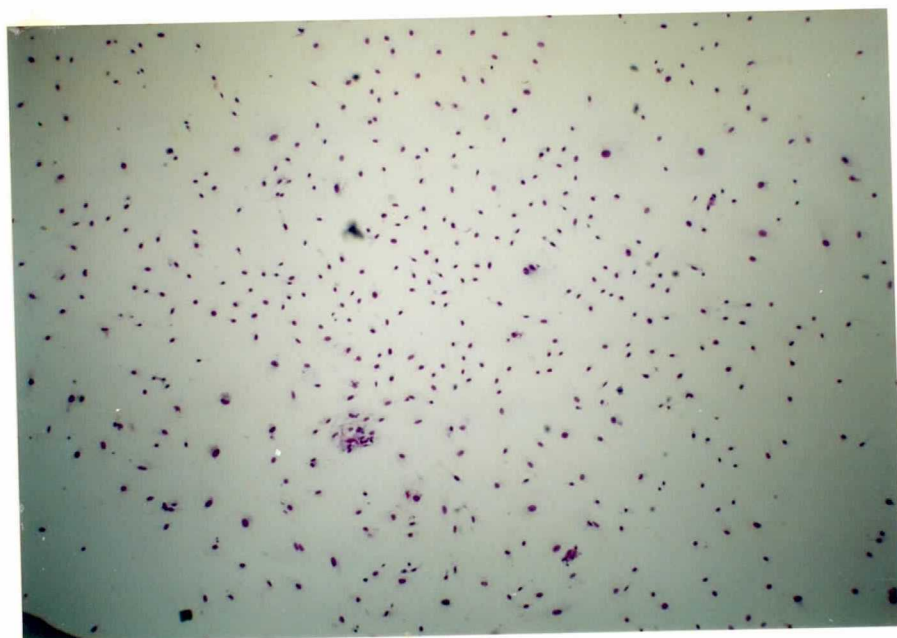
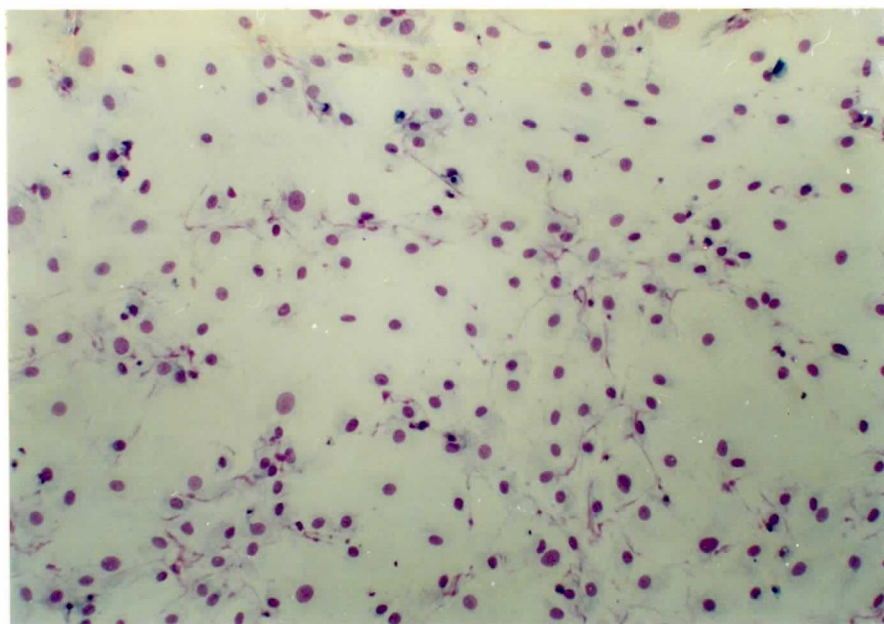
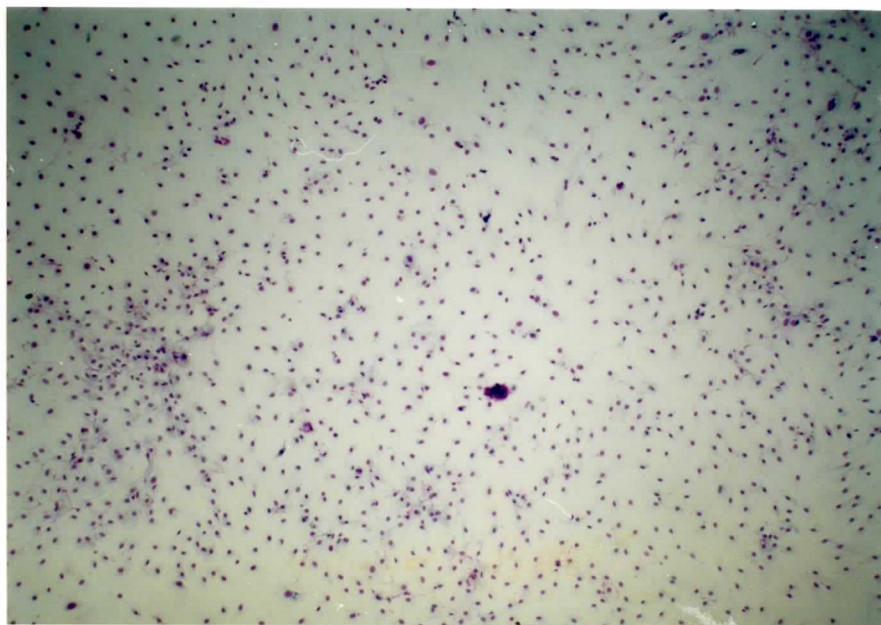


Fig. 103. 5000 μ g FSH. $\times 10$.

Fig. 104. 5000 μ g FSH. $\times 25$.



オ 3 章

顆粒層細胞及び黄体由来細胞に対する Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) の影響

$PGF_{2\alpha}$ はラット、モルモット、羊、牛、馬、豚など多くの動物で、黄体のプロジェステロン分泌低下と黄体の退行を起こすことは、よく知られている。子宮内膜は、雌における $PGF_{2\alpha}$ の主要な生産母地であり、子宮内膜組織または子宮静脈血中の $PGF_{2\alpha}$ 濃度は、性周期の末期に黄体の退行に先行して増加すること、およびこれが黄体退行の役割を演じていることが多くの動物で認められている。また、子宮で生産された $PGF_{2\alpha}$ は、全身的な循環系を介して卵巣に到達するのではなく、子宮-卵巣静脈からこの表面に密着蛇行している卵巣動脈に

Counter current mechanism (Barret ら, '71; McCracken, '71) によって移行して卵巢に直達し、黄体退行を起こすことが綿羊 (Austin ら, '72; Wilson ら, '72; Coudert ら, '72), モルモット (Blatchley ら, '69, '71) などによって証明されている (McCracken ら, '72; Ginther ら, '72, '73, '74)

一方、豚の成熟卵胞液中の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 濃度が排卵の時期が近づくときと顕著に増加して排卵時に最高値に達すること (Ainsworth ら, '75), 家兎 (Le Maire ら, '73; Yang ら, '74) やラット (Bauminger ら, '75; Le Maire ら, '75) 等の成熟卵胞液中の Prostaglandin F (PGF), Prostaglandin E (PGE) についても、豚と同様のことが報告されている。さらに、排卵直前に採取した家兎の顆粒層細胞 (GC) が *in vitro* で $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 を産生すること (Clark ら, '78), PGF を産生すること (Challis ら, '74), PGF, PGE を産生すること (Marsh ら, '74), 牛卵胞 (Shemesh ら, '75),

人卵胞 (Plumkett ら, '75) でも PGF を産生することが報告され, 排卵機構との関連が推察されており, PG は, 黄体期だけでなく, 卵胞期においても, その存在ならびに動態が注目されている。

この章では, 他所由来の $PGF_{2\alpha}$ に対して, 培養細胞レベルにおける GC , LC の反応が見られるかどうかについて, 性周期中の *phase* が明らかな卵巢由来の細胞を中心に, その増殖及びエストロジェン, プロジェステロン産生状況を指標として, その反応性を観察した。

オ 1 節 実験材料及び方法

実験材料

1) 使用培養細胞 (1), (2)

(1) 屠場材料のもので, GCは, 性周期の phase を厳密に限定せず, 直径 7~12 mm のほぼ成熟大の卵胞由来, LCは, ほぼ開花期大もしくはそれに近い大きさの黄体由来のものである。これら GC, LCの継代3代細胞を主に用いたが, LCは, 初代細胞及び一部, 黄体をスライスしたのもも使用した。

(2) 発情期の成熟卵胞由来 GCで次のような GCを使用 (a~d)。

a) 発情と鑑定した2頭の経産牛の屠殺直後に採取したそれぞれ1個の成熟卵胞由来のもので, 1頭の継代3代細胞と, 他牛由来の初代細胞各1例。

b) 正常な性周期を繰り返している

1 頭の未経産牛の 3 回の各発情時にバイオプシーにより採取したそれぞれ 1 個の成熟卵胞由来の初代細胞 3 例。

c) 性周期は経過を追って継続的には確認していないが、発情と鑑定した経産牛からバイオプシーにより採取した 1 個の成熟卵胞由来の初代細胞 1 例。

d) 卵巢機能不全牛 2 頭の各々に PMS 3000 IU, HCG 500 MU を筋注し、4 日後発情が誘発されたものを屠殺して、採取した各牛 1 個あつの成熟卵胞由来の初代細胞 2 例。

2) 供試 $PGF_{2\alpha}$: $PGF_{2\alpha}$ (富士薬品工業(株)) を培養液で溶解し、濾過滅菌したもの。

3) 使用培地 : イーグル MEM 培地「ニッスイ」① を蒸留水で所定の濃度に溶解し

て 121°C で1分間高压滅菌後、冷蔵庫に保存のものに、使用時、L-グルタミンを0.0292%、非動化した新生仔牛血清を10%の割合に添加し、10%炭酸水素ナトリウム溶液でpH 7.2に修正したもの。

実験方法

1) 細胞の採取及び初代培養法

屠殺直後の卵胞のGCを採取する方法は、オ1, 2章と同様である。

一方、生体から直接、発情期の成熟卵胞のGCを採取する方法は、腔壁を介して卵胞内に注射針を刺入して採取した。GCを含んだ採取卵胞液は、CMF溶液(Tyrode Solution からCaとMgとを除いた溶液[Ca, Mg Freeの略])で冷蔵庫に保存のものを使用時には、卵胞液が凝固するのを防ぐ理由で加温せずにそのままの状態で使用)の入っている50 ml ぬい口試験管に速かに注入し、希釈した。800~1000 rpm, 5分間遠沈後、速かに上澄

液を捨て、適当量の培養液を加えてピペッティングしてから再び、上記同様に遠沈した細胞を供試した。

LCの採取は、初代細胞と継代3代細胞を供試した場合とでは異なり、初代細胞を供試した場合は、細切した黄体組織片を50ml三角コルベに移し、0.25%トリプシン溶液20mlを加える。次いで、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て上澄液を捨て、新しい0.25%トリプシン溶液30mlを加え、これにヒアルロニダーゼ400IU、コラゲナーゼ150IUを加えて再び、マグネチックスターラーでゆっくり2時間攪拌した。こうして得た細胞浮遊液を白金メッシュで濾過して、粗大浮遊物を除去し、濾液を50mlぬい口試験管に入れ800rpm、15分間遠沈後、上澄液を捨て、沈渣に培養液をなるべく大量に加えて10ml駒込ピペットでゆるやかに攪拌し、再び上記同様に遠沈した。こ

の状態では、沈渣には細胞塊もかなり含まれているので細胞の計数は困難なので、沈渣に適当量の培養液を加え、ゆるやかに攪拌して30秒程静置して大きい塊を沈澱させた後、上澄液を新しい50mlねい口試験管に入れて再び、上記同様に遠沈した。沈渣に適当量の培養液を加え、ゆるやかに攪拌して、トーマ氏血球計算盤で細胞数を計算し、 $5 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ の濃度になるように培養液5mlを入れたT0-15培養瓶に細胞を移植して、 36°C 孵卵器内で静置培養した。

継代3代細胞を供試した場合は、オス章と同様である。

黄体のスライスも供試した場合は、培養液5ml中に約 2mm^3 に細切した黄体のスライス片約20個を投入し、 36°C 孵卵器内で静置培養した。

2) 供試細胞、細胞数の算定時期及び方法

Gc, Lcの継代3代細胞を供試した。細胞数算定の時期, 方法及び細胞の継代法はオス章と同様である。

初代培養は, Gc, Lc共に細胞を採取後, 培養瓶1個に対して必要な細胞数を算定して移植した。しかし, 培養後の初代細胞は, トリプシン処理する際にこわれやすく, 細胞塊も多く, 正確に細胞数を算定するには無理であったので, 初代細胞を供試したものは, 培養液中に分泌されたホルモン定量用として培養上澄液を採取した。

3) 培養上澄液採取

Gc, Lcの継代3代細胞, 発情期のGcの初代細胞を供試したものは, オス章と同様である。

Lcの初代細胞を供試したものは, 一つの黄体から得た細胞を2群に分けて同時に培養を開始し, 上澄液採取時期は, 培養96時間と142時間とした。

黄体のスライスを供試したものは、培養48時間後に上澄液を採取した。採取した培養上澄液は、1200 rpm, 5分間遠沈して、その遠沈上澄液を -20°C に凍結保存して、プロジェステロン定量用とした。

4) 細胞の観察

オリ，ス章と同様である。

5) $\text{PGF}_{2\alpha}$ の添加

培養開始時に5mlの培養液中に $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で添加した。

6) エストロジェン，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当該ホルモン定量法に準じた(牧野, '73; 神戸川, '75; 吉田, '73)。

オ 2 節 実験成績

1) 層場材料由来の顆粒層細胞, 黄体由来細胞の継代3代細胞に対する影響

a) 細胞増殖に及ぼす影響

GCに対しては, やや増殖を抑制する傾向がみられ, Controlを100とした場合, $0.1\mu\text{g}/20\text{ml}$ 添加では81, $50\mu\text{g}/20\text{ml}$ 添加では78を示した。

LCに対しては, 添加した範囲内 ($0.001 \sim 50\mu\text{g}/20\text{ml}$) では, それほどの差はみられなかった。しかし, 多少増殖が促進されるようであり, その程度は106~130の範囲内であった(表15)。

比較対照としてのHela-S3細胞も $\text{PGF}_{2\alpha}$ によって増殖がかなり抑制され, $50\mu\text{g}/20\text{ml}$ では59であった(表15)。

b) エストロジェン, プロジェス

テロン産生に及ぼす影響

GC培養に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を添加した結果、エストロジェン産生は、Controlにくらべ、明瞭な差がなかった(表16)。プロジェステロン産生は、Controlが 10.3 ng/ml であったが $0.1 \mu\text{g}/20 \text{ ml}$ 添加では 42.5 ng/ml であり、添加量を増やしたがい増加し、 $50 \mu\text{g}/20 \text{ ml}$ 添加では 130.0 ng/ml を示した(表16)。

LC培養に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を添加した結果、エストロジェン産生は、大部分のものが 5 pg/ml 以下で Control にくらべ、明瞭な差がなかった(表16)。プロジェステロン産生は、 $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/20 \text{ ml}$ 添加で Control より高い値を示した(表16)。

2) 屠場材料由来の黄体由来細胞の 初代細胞及びスライス片のプロ ジェステロン産生に及ぼす影響

初代細胞のプロジェステロン産生は、96時間培養した場合、無添加区は 315 ng/ml 、

PGF_{2α} 10 μg/ml 添加区は 382 ng/ml と無添加区に比較してやや高い値を示した。さらに培養時間を 46 時間延長した場合、無添加区は 301 ng/ml と 96 時間培養の値とほぼ同様であったが PGF_{2α} 10 μg/ml 添加区は 680 ng/ml であり、96 時間培養の値より増加した。また、PGF_{2α} の添加量を増やにつれてプロジェステロン産生量が増加する傾向が認められた (表 17)。

黄体のスライス片を用いた実験においては、添加量 0.001 ~ 50 μg/ml の範囲では、いずれも無添加より高い値を示した (表 18)。

3) 発情期の成熟卵胞由来顆粒層細胞のエストロジェン、プロジェステロン産生に及ぼす影響(a~d)

- a) 発情と鑑定した 2 頭の経産牛屠殺直後に採取した各牛 1 頭の成熟卵胞由来のうち、1 頭の継代 3 代細胞と他牛由来の

初代細胞各1例について。

継代3代細胞のエストロジェン産生は、無添加区の E_2 が 28.4 pg/ml にくらべ、 $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区が 151.0 pg/ml 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加区では 794.0 pg/ml と著しく高値を示したから $50 \mu\text{g/ml}$ 添加区では 10 pg/ml 以下であった。 E_1 は、無添加区及び添加区ともに産生量は少なく、明瞭な差は認められなかった。また、 E_3 は 5 pg/ml 以下もしくは、わずかに検出できる程度の量であった(表19)。

初代細胞のエストロジェン産生は、 E_1 、 E_2 、 E_3 とも無添加区にくらべ、明瞭な差は認められなかった。しかし、無添加区、添加区とも E_1 、 E_2 の値は、これまで著者らが非発情期の乳牛のGCを用いて行ったGTHあるいは、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 添加試験の成績とくらべて極めて高い値であった。 E_3 は、 5 pg/ml 以下であった(表20)。

プロジェステロンの産生量は少なく、無添加区での産生量以下のもの、あるいは辛

うじて検出できる程度の量であった(表20)。

- ㊦) 正常な性周期を繰り返している
1頭の未経産牛の3回の各
発情時にバイオプシーにより
採取したそれぞれ1個の成熟
卵胞由来の初代細胞3例につ
いて。

由来の異なる3例(実験A, B, C)につ
いてそれぞれ試験した。

実験A; エストロジェン産生は、無添
加区の E_1 から 225.0 pg/ml , E_2 から 1087.2 pg/ml で
あり, $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区では, ほぼ同じであっ
たから $10 \mu\text{g/ml}$ 添加区の E_1 から 418.0 pg/ml , E_2 から
 1394.0 pg/ml であり, 無添加区にくらべ, 高
い値であった。 E_3 は, 無添加区の 7.5 pg/ml
にくらべ, 添加区では, やや高い値が観察
された(表21のA欄)。

プロジェステロン産生は, 無添加区及び
 $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区間では, 明瞭な差はなかった

が $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区では $8.2 \text{ ng}/\text{ml}$ であり, 無添加区の $96.8 \text{ ng}/\text{ml}$ にくらべて, かなり低い値であった (表 21 の A 欄)。

実験 B; エストロジェン産生は, 無添加区の E_1 は $43.4 \text{ pg}/\text{ml}$, E_2 は $178.0 \text{ pg}/\text{ml}$ であるのにくらべて $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区の E_1 は $24.2 \text{ pg}/\text{ml}$, E_2 は $204.0 \text{ pg}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区では, E_1 は $73.6 \text{ pg}/\text{ml}$, E_2 は $214.0 \text{ pg}/\text{ml}$ であり, 無添加区にくらべて添加区は, やや高い値であった (表 21 の B 欄)。

プロジェステロン産生は, 無添加区は $412.0 \text{ ng}/\text{ml}$ であるのにくらべて, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区では $327.0 \text{ ng}/\text{ml}$ と低い値であったが, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区では $513.0 \text{ ng}/\text{ml}$ と無添加区, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区にくらべて, 高い値であった。なお, 無添加区, 添加区ともに, 今回, 実施した各群 (表 16, 19~23) の中で最も高い値であった (表 21 の B 欄)。

実験C； エストロジェン産生は，無添加区，添加区間においては，明瞭な差は認められなかったが， E_1 ， E_2 の産生量は，実験Bより高い値であった。なお， E_3 は， 5pg/ml 以下であった（表21のC欄）。

プロジェステロン産生は，無添加区の 21.8ng/ml にくらべ， $10\mu\text{g/ml}$ 添加区は 46.8ng/ml と約2倍量であった（表21のC欄）。

- C) 性周期は確認していないが，発情と診断した経産牛からバイオフィンにより採取した1個の成熟卵胞由来の初代細胞1例について。

エストロジェン産生は， $2\mu\text{g/ml}$ 添加区の E_2 が 151.0pg/ml であり，無添加区， $0.2\mu\text{g/ml}$ 添加区とくらべ，特に高い値であった（表22）。

プロジェステロン産生は，無添加区の 167.0ng/ml にくらべ， $2\mu\text{g/ml}$ 添加区では 121.0ng/ml であり， $0.2\mu\text{g/ml}$ 添加区より高い値

であったが、無添加区より低い値であった（表 22）。

d) 卵巣機能不全牛 2 頭の各々に PMS 3000 IU, HCG 500 MU を筋注射し、4 日後発情が誘発されたものを屠殺して、採取した各牛 1 個ずつの成熟卵胞由来の初代細胞 2 例について。

2 頭の牛（実験 A, B）について試験した。

実験 A ; エストロジェン産生は、無添加区の E_1 が $23.1 \times 10^2 \text{ pg/ml}$, E_2 が $67.4 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ であり、 $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区は、 E_1 が $31.6 \times 10^2 \text{ pg/ml}$, E_2 が $75.9 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ と高い値であった。 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加区では、 E_1 が $28.5 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ と無添加区の E_1 より高い値であったが、 $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区の E_1 より低い値であった。 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加区の E_2 は $99.3 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ で $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区の E_1 より高い値であり、添加量に比例して増加する傾向が認められた。なお、 E_3 の産生量は、

他の試験例と同様に少なく、各区間に明瞭な差は認められなかった（表23のA欄）。

プロジェステロン産生は、エストロジェン産生とは対象的で、今回、実施した各群（表16, 19~23）の中で最も低い値であった（表23のA欄）。

実験B： エストロジェン産生は、無添加区の E_1 が $5.3 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ 、 E_2 が $4.3 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ にくらべて $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区の E_1 が $11.5 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ 、 E_2 が $8.7 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ と高い値であった。 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加区は、 E_1 が $7.4 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ 、 E_2 が $5.7 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ であり $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区より高い値であった。 E_3 の産生量は、同様に少なく、明瞭な差は認められなかった（表23のB欄）。

プロジェステロン産生は、無添加区の 204.0 ng/ml にくらべて、 $1 \mu\text{g/ml}$ 添加区は 315.0 ng/ml と高い値であったが $10 \mu\text{g/ml}$ 添加区は無添加区とほぼ同値であった。なお、産生量は、今回、実施した各群（表16~23）の中

で2番目に高い値であった(表23のB欄)。

オ 3 節 考 察

培養 GC に及ぼす $\text{PGF}_{2\alpha}$ の影響として、まず、屠場材料のもので、性周期の phase を厳密に限定せずに、GC を採取した卵胞は、大きさを基準にして分類し、直径 7~12 mm のほぼ成熟した卵胞由来 GC の継代 3 代細胞を供試した場合は、添加量に比例して細胞の増殖が抑制された反面、プロジェステロン分泌は強く促進され、GC に対しても $\text{PGF}_{2\alpha}$ は、作用を及ぼすことが示唆されたが、一方、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ は、卵巣由来細胞以外の Hela-S3 細胞に対しても細胞の増殖を抑制する作用が認められたので、GC の増殖を抑制する作用が、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の特異作用でないことも示唆された。

次に、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ が発情時において、細胞の発育やエストロジェン産生を促進するのではないかと想定のもとに、発情、ひいてはこれに関連してエストロジェン産生と

$\text{PGF}_{2\alpha}$ の因果関係を知するため、発情期のGCの継代3代細胞1例と初代細胞7例を試した。

まず、発情と判定した屠場材料の卵巣由来の培養3代GCに $\text{PGF}_{2\alpha}$ を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加すると E_2 産生量は、無添加対照の $28.4\text{pg}/\text{ml}$ にくらべ $794.0\text{pg}/\text{ml}$ と極めて高い値を示した。また、別の屠場材料でやはり発情と判定した卵巣由来の培養初代GCを用いた実験では、対照と添加したものではそれほど差が認められなかった。

このような反応の違いは細胞の継代代数によるのか、採取したGCそのものの持つ本質的な感受性の違いかは不明である。

次に、発情時を確実に把握するために発情周期を継続的に観察した個体の発情時の成熟卵巣由来の培養初代GCでは、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 無添加対照及び添加群のすべてが、上述の屠場材料にくらべ、極めて高いエストロジエン値を示した。また、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 添加は、エ

エストロジェンの産生を多少促進したと思われる成績が得られた。

すなわち、同じ方法で培養しても、GC採取時期によりエストロゲン産生能にかなりの違いが認められるようである。

発情周期は、厳密に観察していなかったが、発情徴候を示しているものからの培養初代GCのエストロゲン産生量は、対照では、 E_2 が 30.6 pg/ml 、 $PGF_{2\alpha}$ $2 \mu\text{g/ml}$ 添加で 151.0 pg/ml と高値を示したにか $0.2 \mu\text{g/ml}$ 添加では 19.0 pg/ml と対照よりも低い値を示した。この場合、 $PGF_{2\alpha}$ の添加量による影響を忠実に反映しているかどうかは1例であるためなんともいえない。

次に、PMS、HCGを投与して、人為的に発情をおこさせた卵胞由来GCの初代培養について E_2 値を観察すると、他の試験群にくらべ、 $PGF_{2\alpha}$ 無添加のもの、及び添加区のものとも数倍～数十倍の値を示した。なお、 $PGF_{2\alpha}$ 添加は、多少エストロゲン産

生を促進するのではないかと思われた。

なお、全般を通じて E_1 は E_2 より産生量は少ないか動きとしては、類以した所見がみられ、 E_3 については、絶対量が少ないのははっきりした傾向は不明である。

プロジェステロン産生は、試験した細胞の由来により産生量に差がみられたが、 $PGF_2\alpha$ 添加による一定の傾向はないようであり、また、分泌抑制も認められなかったが、この臭か層場材料のもので性周期の phase を厳密に限定せずに、ほぼ成熟大の卵胞由来 GC の継代3代細胞を供試した結果とは異なるが、GC とプロジェステロン産生の *in vitro* での検討があまりなされていないので、はっきりしたことはいえない。

なお、培養細胞といえども、採取時にすでに受けていた生体内での諸感作の違いによって反応性にかなり差があるように思われ、単に発情期といえども、さらに詳細な status による分類がこの種の実験には必要

と思われた。

培養 LC に対して $\text{PGF}_{2\alpha}$ を添加した場合、GC の場合にみられるような細胞の増殖抑制作用は認められず、添加した範囲内ではそれほど差は認められなかった。

しかし、プロジェステロン産生は、多少、促進的な傾向がみられた。この結果は、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ が *in vivo* で黄体の退行をうながし、また、プロジェステロンの分泌を抑制する効果とは一致しない成績である。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ が黄体に対して *in vitro* では、プロジェステロン分泌を増加させることが報告 (Seproffs, '70; Pharris ら, '68; Sellner ら, '72) されており、この理由について Cholesterol 自身が変化を受けやすくなるが、PG がそれを促進するという報告 (Behrman ら, '71) や、 PGE は $3',5'$ -AMP を刺激し、その $3',5'$ -AMP が黄体のステロイド生合成を促進するという報告 (Joneson ら, '74) もある。逆に、 $3',5'$ -AMP も PG の産生を促進するとの報告

(Marsh ら, '74) もあり, その機構としては, 3',5'-AMP が phospholipase, cholesterol, esterase, triglyceridelipase などを活性化させ脂肪酸のエステル型をフリー型に変え, この遊離型の脂肪酸が PG に変換されるのではないかと述べている。しかし, 一方では, 高濃度の 3',5'-AMP は, GC からの PGF の生成を阻害するとの報告(Challis ら, '74) もあり, いまだ充分に解明されていないので, さらに *in vivo*, *in vitro* 両面から検討する必要があると思われた。

Table 15. Effects of PGF₂ α on cell development of the granulosa, luteal and Hela-S3 cells in culture, expressed as % of number of cells against that in control without PG(100%)

PGF ₂ α (μ g/ml)	Granulosa cell	Luteal cell	Hela-S3 cell
Control	100%	100%	100%
0.001	/	106	/
0.01	/	118	/
0.1	81	112	95
0.5	/	119	/
1	88	130	87
5	/	121	/
10	76	116	76
30	/	/	78
50	78	107	59

/ : not tested.

Table 16. Effects of PGF₂ α on cell number and progesterone, estrogen production by the granulosa and luteal cells in culture

PGF ₂ α (μ g/ml)	Granulosa cell				Luteal cell			
	No. of cell $\times 10^4$ (%)	Progeste- rone ng/ml	Estro- gen pg/ml	Culture period days	No. of cell $\times 10^4$ (%)	Progeste- rone ng/ml	Estro- gen pg/ml	Culture period days
0.001	/	/	/	6	82 (136)	6.4	<10.0* <10.0 <5.0	5
0.01	/	/	/		39 (65)	13.8	<10.0 <10.0 <5.0	
0.1	34 (106)	42.5	16.2* 11.6 <5.0		68 (113)	23.1	<10.0 <10.0 <5.0	
1	23 (71)	58.3	14.7 10.5 <5.0		68 (113)	36.3	<10.0 <10.0 6.5	
10	21 (65)	85.6	13.3 11.3 <5.0		61 (101)	32.2	<10.0 <10.0 <5.0	
50	19 (59)	130.0	18.5 11.6 <5.0		46 (76)	21.1	12.0 <10.0 <5.0	
Control	32 (100)	10.3	15.7 10.8 <5.0		60 (100)	10.2	<10.0 13.9 <5.0	

* Figures of top, middle, and bottom in each column represent the values of estrone, estradiol, and estriol respectively.

<: undetectable at the level indicated.

/: not tested.

Table 17. Effects of PGF₂ α on progesterone
production by the primary culture
of the luteal cells

PGF ₂ α (μ g/ml)	Progesterone (ng/ml)	Culture period (hours)	No. of cells transplanted
none	315	96	26.22 \times 10 ⁵ /ml
1	/		
10	382		

none	301	142	26.22 \times 10 ⁵ /ml
1	568		
10	680		

Table 18. Effects of PGF₂ α on progesterone secretion of bovine corpus luteum in vitro(48-hour culture)

PGF ₂ α (μ g/ml)	Progesterone production (ng/ml)
none	425
0.001	587
0.1	577
10	567
50	510

Table 19. Effects of PGF₂ α on estrogen production by the tertiary culture of the granulosa cells harvested from large follicle of the estrous cow after slaughter

PGF ₂ α (μ g/ml)	Estrogen(pg/ml)			Culture period (days)	No. of cells transplanted
	E1	E2	E3		
none	34.5	28.4	<5.0	6	1×10^5 /5ml
0.1	13.0	<10.0	<5.0		
1	14.1	151.0	8.0		
10	26.4	794.0	<5.0		
50	28.9	<10.0	<5.0		

notes: It was not surveyed whether the cow had shown a normal estrous cycle.

<: means that the amount was undetectable at the level indicated.

Table 20. Effects of PGF₂ α on estrogen and progesterone production by the primary culture of the granulosa cells harvested from large follicle of the estrous cow after slaughter

PGF ₂ α (μ g/ml)	Estrogen(pg/ml)			Progesterone(ng/ml)	Culture period (days)	No. of cells transplanted
	E1	E2	E3			
none	134.0	194.0	<5.0	1.3		
1	125.0	171.0	<5.0	1.2	7	20 \times 10 ⁵ /5ml
10	153.0	178.0	<5.0	0.9		

notes: It was not surveyed whether the cow had shown a normal estrous cycle.

<: means that the amount was undetectable at the level indicated.

Table 21. Effects of PGF₂ α on estrogen and progesterone production by the primary culture of the granulosa cells harvested from large preovulatory follicle of the estrous heifers.

Test No.	PGF ₂ α (μ g/ml)	Estrogen(pg/ml)			Progesterone(ng/ml)	Culture period (days)	No. of cells transplanted
		E1	E2	E3			
A	none	225.0	1087.2	7.5	96.8		
	1	235.0	1049.0	14.1		7	$12.3 \times 10^5/5\text{ml}$
	10	418.0	1394.0	9.9	8.2		
B	none	43.4	178.0	<5.0	412.0		
	1	24.2	204.0	<5.0	327.0	5	$15.7 \times 10^5/5\text{ml}$
	10	73.6	214.0	<5.0	513.0		
C	none	132.0	507.0	<5.0	21.8		
	10	114.0	451.0	<5.0	46.8	5	$13.0 \times 10^5/5\text{ml}$

notes: These heifers showed normal estrous cycles.

<: see Table 19 and 20.

Table 22. Effects of PGF₂ α on estrogen and progesterone production by the primary culture of the granulosa cells harvested from large preovulatory follicle of the estrous cow

PGF ₂ α (μ g/ml)	Estrogen(pg/ml)			Progesterone(ng/ml)	Culture period (days)	No. of cells transplanted
	E1	E2	E3			
none	17.1	30.6	<5.0	167.0		
0.2	28.1	19.0	<5.0	63.7	7	10.5 \times 10 ⁵ /5ml
2	12.1	151.0	7.0	121.0		

note: see Table 19 and 20.

Table 23. Effects of PGF₂ α on estrogen and progesterone production by the primary culture of the granulosa cells harvested from large preovulatory follicle of estrous cows after slaughter.

Test No.	PGF ₂ α (μ g/ml)	Estrogen(pg/ml)			Progesterone(ng/ml)	Culture period (days)	No. of cells transplanted
		E1 $\times 10^2$	E2 $\times 10^2$	E3			
A	none	23.1	67.4	12.8	1.1	7	$13.3 \times 10^5/5\text{ml}$
	1	31.6	75.9	15.8	1.0		
	10	28.5	99.3	17.2	1.0		
B	none	5.3	4.3	<5.0	204.0	16	not counted
	1	11.5	8.7	<5.0	315.0		
	10	7.4	5.7	<10.0	239.0		

note: These cows were given intramuscular injections of 500MU HCG and 3000IU PMS before 4 days of slaughter, followed by induced estrous.

オ 4 章

総括ならびに結論

牛の GC (顆粒層細胞) 及び LC (黄体由来細胞) を培養し、その細胞について諸種の実験を行った。それらの成績の概要は次のとおりである。

1. GC, LC は *in vitro* でよく増殖し、普通数日で底面全般に拡がり、継代培養も可能である。

2. 形態： 卵胞と黄体からそれぞれ採取したときの GC, LC は、いずれも球状を呈しているが培養した場合は底面に付着し扁平となり、上皮細胞様形態を示す。

3. ホルモン産生： ホルモン測定は、

細胞が底面全般に増殖した時臭で測定した（概ね1週間前後）。

培地中へのエストロジェン及びプロジェステロンの産生量は、細胞を採取した卵巢周期の時期やホルモン産生量を測定したときの継代代数によっても差がみられるが、影響の最も強いのは採取時の卵巢周期ではないかと思われる成績が得られた。

(1) GCについて

A. 層場材料： 卵巢の phase のはっきりしない卵胞由来の GC (培養3代目細胞使用) では、培養上澄液中のエストロジェンは検出限界 ($5 \sim 10 \text{ pg}$) 以下、プロジェステロンは 3.8 ng/ml であった。

B. 発情期卵胞由来： ちなみに *estradiol* (E_2) について観察すると、実験群中最高は $67.4 \times 10^2 \text{ pg/ml}$ であり、極めて高く、プロジェステロンも最高 412 ng/ml で、他の phase 由来のものと大差がみられた。

プロジェステロンの高かったのはGCの黄体細胞への機能的推移が示唆された。

(2) LCについて

A. 屠場材料の黄体由来細胞であるが、いずれも培養液中には、エストロジェンは辛うじて検出できる程度(10pg/ml 前後)であり、プロジェステロンは最高 362ng/ml 程度で、GCにおけるような大きな変動はみられなかった。

4. GTH(性腺刺激ホルモン)のGC, LCに対する反応。

(1) 単独添加の場合

A. 増殖について; HCG, Prolactin, FSH, LHの各添加は一般にGC, LCの発育増殖を促進し、とくにProlactinはHCG以上の作用がみられた。

各GTHとも、添加濃度に比例して、増殖を促進する傾向がみられたがPMSはGC,

LCの増殖に対しては明らかに抑制的に作用した。

B. ホルモン産生について： 屠場材料の中卵胞由来GC及びかなり大きい黄体由来LC等に対しては、多少分泌を刺激したのではないかと思われる程度で、それほど明瞭な結果は得られなかった。

(2) 混合添加の場合

A. 増殖について： GC, LCとも本実験での添加範囲内ではGTH相互の協合作用は認められなかった。

B. ホルモン産生について： PMSの添加により、GC, LCともわずかにプロジェステロンの分泌が刺激されるようにも思えたが明瞭ではなかった。

5. $PGF_{2\alpha}$ のGC, LCに対する反応

屠場材料から得たGC及びLCはともに成熟した卵胞、黄体由来の3代細胞あるいは

生体からバイオフィノーにより採取した初代細胞を用いた。

A. 増殖について： GCに対しては増殖を多少抑制し， LCに対しては若干刺激するように思われた。

B. ホルモン産生について： GCに対しては， プロジェステロン産生を顕著に促進したか発情期卵胞由来のものは， 明瞭な傾向は把握できなかった。 エストロジェン産生については， 発情期卵胞由来のものは， 8例全例中5例に産生をやや促進したと思われる結果が得られた。

LCに対しては， プロジェステロンの産生を促進するような傾向がみられた。 エストロジェン産生については明瞭な傾向は把握できなかった。 黄体のスライスを用いた場合も， ほぼ同じ結果が観察された。

以上の結果， 卵胞及び黄体由来の GC, LC の培養細胞を用いての実験は， 複雑な支配機構によって営まれている生体での繁殖関

連現象を単純化して、解析的にこれらを究明する上に有効に利用できる手法と考えられる。

今回の実験においても、生体に投与した場合は、卵胞の発育に対して極めて活発な促進作用を持つ PMS が *in vitro* においては、これを抑制する作用が認められたこと、あるいは、生体に対して投与した場合には強力な黄体退行作用やプロジェステロン分泌抑制作用のある PGFS が *in vitro* では、そのような作用を全く示さないことなど興味ある所見も得られた。

なお、この種の実験をあるとき、今後に残された問題点として、

1. 生体内で細胞が置かれていた環境条件を考慮する必要性があること。

2. 細胞の性状を希一化する手段として継代することの是非などについてさらに検討する余地のあること。

等が重要と思われた。

謝 辞

本研究は麻布大学獣医学部教授大地隆温博士の御鞭撻と御懇篤なる御指導ならびに御校閲の賜物であり、ここに深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、御校閲と御懇篤な御指導を賜わりました麻布大学教授中村経紀博士ならびに江口保暢博士に対し衷心より感謝致します。

また本研究の推進に御支援を賜った神奈川県食肉衛生検査所相模原支所、厚木支所ならびに津久井支所の関係各位に対し心より謝意を表します。

最後に本研究の遂行に当って、多大の御協力も戴いた麻布大学獣医学部繁殖学講座紫野正雄助教授ならびに教室員の諸氏に謝意を表します。

文 献

1. Ainsworth, L., Robert, D. B. and David, T. A. (1975)
Follicular fluid prostaglandin F levels in swine.
Prostaglandins 9, 915-925.
2. Barrett, S., Blocky, M. A. de B., Brown, J. M. (1971).
Initiation of the oestrous cycle in the ewe by infusions of
PGF /to the auttransplanted ovary.
J. Reprod. Fertil. 24, 136-137.
3. Bartosik, D., Romanoff, E. B., Watson, D. J. and Scricco
E. (1967).
Luteotropic effects of prolactin in the bovine ovary.
Endocrinology 81, 186-194.
4. Bauminger, S. and Lindner, H. R. (1975).
Perioovulatory changes in ovarian prostaglandin formation
and their hormonal control in the rat.
Prostaglandins 9, 737-751.
5. Behrman, H. R., MacDonald, G. J. and Greep, R. O. (1971).
Regulation of ovarian cholesterol esters: Evidence for the
enzymatic sites of prostaglandin-induced loss of corpus
luteum function.
Lipids 6, 791-796.
6. Blatchley, F. R. and Donovan, B. T. (1969).
Luteolytic effect of prostaglandin in the guinea-pig.
Nature 221, 1065-1066.

7. Blatchley, F. R. and Donovan, B. T. (1971).
Identification of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the utero-ovarian
blood of guinea-pig after treatment with oestrogen.
Nature 230, 243-244.
8. Carrel, A. (1913).
Artificial activation of the growth in vitro of connective
tissues.
J. Exp. Med. 17, 14-19.
9. Challis, J. R. G., Erickson, G. F. and Ryan, K. J. (1974).
Prostaglandin F production in vitro by granulosa cells
from rabbit pre-ovulatory follicles.
Prostaglandins 7, 183-193.
10. Channing, C. P. (1966).
Progesterone biosynthesis by equine granulosa cells growing
in tissue culture.
Nature 210, 1266.
11. Channing, C. P. (1969).
Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types
in tissue culture.
J. Endocrinol. 45, 297-308.
12. Channing, C. P. (1969).
Studies on tissue culture of equine ovarian cell types:
Pathways of steroidogenesis.
J. Endocrinol. 43, 403-414.
13. Channing, C. P. (1970).
Effects of stage of the menstrual cycle and gonadotropins
on luteinization of rhesus monkey granulosa cells in culture.
Endocrinology 87, 49-60.

14. Channing, C.P. (1973).
Factors involved in luteinization in vitro. In: Proceedings
of the IV symposium of endocrinology held at Washington D.C.
June 1973., pp.340-345, Excerpta Medica, Amsterdam.
15. Channing, C. P. (1974).
Binding of gonadotropins to ovarian cells.
Biol. Reprod. 10, 179-198.
16. Clark, M. R., Triebwasser, W. F., Marsh, J. M., Lemaire,
W. J. (1978).
Prostaglandins in ovulation.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 18, 427-434.
17. Coudert, S. P., Phillips, G. D., Palmer, M. and Faiman, C.
(1972).
Prostaglandin F concentration in the peripheral blood of
the ewe during the estrous cycle.
Prostaglandins 2, 501-509.
18. 江渡八郎 (1981).
家畜診療所の実態調査結果について, 家畜診療 218,
35-43.
19. Fevold, H. L., Hisaw, F. L. and Leonard, S. L. (1937).
The gonad stimulating and the luteinizing hormones of the
anterior lobe of the hypophysis.
Am. J. Physiol. 97, 291-301.
20. 深田治夫・佐藤 彰 (1955).
乳牛の繁殖状況調査 —特に繁殖障害について—
家畜繁殖誌 1, 81-88.
21. 袋地登志雄 (1981).
特定損害防止事業の実施状況, 家畜診療 219, 45-52.

22. Ginther, O. J. and Bisgard, G. E. (1972).
Role of the Main uterine vein in local action of an
intrauterine device on the corpus luteum in sheep.
Am. J. Vet. Res. 33, 1583-1587.
23. Ginther, O. J., Del Campo, C. H., Rawlings, C. A. (1973).
Vascular anatomy of the uterus and ovaries and unilateral
luteolytic effect of the uterus: A local venoarterial
pathway between uterus and ovaries in sheep.
Am. J. Vet. Res. 34, 723-728.
24. Ginther, O. J. and Del Campo, C. H. (1974).
Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the
unilateral luteolytic effect of the uterus: Cattle.
Am. J. Vet. Res. 35, 193-203.
25. Gospodarowicz, D. (1971).
Immunologic and Steroidogenic activity of the luteinizing
hormone(LH) compared to its two subunits: CI and CII.
Endocrinology 89, 669-678.
26. Gospodarowicz, D. and Gospodarowicz, F. (1972).
Technique for the isolation of bovine luteal cells and its
application to metabolic studies of luteal cells in vitro.
Endocrinology 90, 1427-1434.
27. Hansel, W. and Snook, R. B. (1970).
Pituitary ovarian relationships in the cow.
J. Dairy Sci. 53, 945-961.
28. Harrison, R. G. (1907).
Observations on the living developing nerve fiber.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4, 140-143.

29. Hoffmann, B., Schams, D., Bopp, R., Ender, M. L. (1974).
Luteotropic factors in the cow: Evidence for LH rather
than prolactin.
J. Reprod. fertil. 40, 77-85.
30. Jonsson, H. T., Shelton, V. L. and Baggett, B. (1972).
Stimulation of adenyl cyclase by prostaglandins in rabbit
corpus luteum.
Biol. Reprod. 7, 107.
31. 神戸川 明 (1975).
エストロゲン, 最新医学 30, 790-798.
32. 黒田行昭 (1974).
動物組織培養法, 共立出版, 東京.
33. LeMaire, W. J., Yang, N. S. T., Behrman, H. H. and Mardh,
J. M. (1973).
Preovulatory changes in the concentration of prostaglandins
in rabbit graafian follicles.
Prostaglandins 3, 367-376.
34. LiMaire, W. J., Leidner, R. and Marsh, J. M. (1975).
Pre and Post ovulatory changes in the concentration of
prostaglandins in rat graafian follicles.
Prostaglandins 9, 221-229.
35. MaCracken, J. A. (1971).
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ and corpus luteum regression.
Ann. New York Acad. Sci. 180, 456-472.
36. MaCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J.
R., Green, K. and Samuelsson, B. (1972).

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ identified as a luteolytic hormone in sheep.

Nature New Biol. 238, 129-134.

37. Marsh, J. M., Yang, N. S. T. and LeMaire, W. J. (1974).
Prostaglandin synthesis in rabbit graafian follicles in vitro. Effect of luteinizing hormone and cyclic AMP.
Prostaglandins 7, 269-283.
38. Pharriss, B. B. and Wyngarden, L. J. (1969).
The effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 92-94.
39. 牧野拓雄 (1973).
性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay
日内分泌学誌 49, 629-645.
40. 牧野拓雄・神戸川 明・吉田孝雄・田 根 培・向井久晴・山地瑞雄・
尾崎晴彦・高木繁夫 (1973).
Radioimmunoassay による血中 Progesterone の簡易測定法
臨床病理 21, 930-934.
41. 中原達夫 (1981).
牛の卵巣疾患について, 家畜診療 222, 3-16.
42. 老田 剛 (1963).
乳牛における繁殖障害疾患の治療と廃用の実態について
家畜繁殖誌 8, 1-5.
43. Plunkett, E. R., Moon, Y. S., Zamecnik, J., Armstrong, D. T. (1975).
Preliminary evidence of a role for prostaglandin F in human Follicular function.
Am. J. Obstet. Gynec. 123, 391-397.

44. Ryan, K. J. and Short, R. V. (1965).
Formation of estradiol by granulosa and theca cells of the equine ovarian follicle.
Endocrinology 76, 108-114.
45. Sayers, G., Portanova, R. , Beall, R. J., Seelig, S. and Malamed, S. (1971).
In vitro methods in reproductive cell biology. In:
In: Karorinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, 3rd symposium.
46. Schomberg, D. W. and Tyrey, L. (1972).
Uptake of (^{131}I)Human chorionic gonadotropin(HCG) by porcine granulosa cells under incubation and culture conditions.
Biol. Reprod. 7, 127.
47. Sellner, R. G. and Wickersham, E. W. (1972).
Effects of prostaglandins on steroidogenesis by rabbit ovarian tissue in vitro.
Biol. Reprod. 7, 107.
48. Shemesh, M. and Hansel, W. (1975).
Stimulation of prostaglandin synthesis in bovine ovarian tissues by arachidonic acid and luteinizing hormone.
Biol. Reprod. 13, 448-452.
49. Short, R. V. (1972).
Hormones in reproduction. In: Reproduction of mammals (Austin, C. R. and Short, R. V., eds.), Cambridge University Press, Cambridge.
50. Speroff, L. and Ramwell, P. W. (1970).
Prostaglandin stimulation of in vitro progesterone synthesis.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 345-350.

51. Sulman, F. G. (1952).
Intravaginal assay of estrogens.
Endocrinology 50, 61-67.
52. 東條龍太郎 (1978).
培養顆粒膜細胞の形態学的研究, 日不妊会誌 23,
302-315.
53. Wilson, L., Cenedella, R. J., Butcher, R. L. and Inskeep,
E. K. (1972).
Levels of prostaglandins in the uterine endometrium during
the ovine estrous cycle.
J. Anim. Sci. 34, 93-99.
54. Yang, N. S. T., Marsh, J. M. and LeMaire, W. J. (1974).
Post ovulatory changes in the concentration of
prostaglandins in rabbit graafian follicles.
Prostaglandins 6, 37-44.
55. 吉田孝雄・田根培・向井久晴・野田正和・高木繁夫・牧野拓夫・
神戸川明 (1973).
性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay — プロゲステロンの
Radioimmunoassay —
ホルモンと臨床 21, 105-111.