

氏名 (本籍)	川上 静夫 (山梨県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第232号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	「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——
論文審査委員	(主査) 教授 大地 隆温 (副査) 教授 中村 経紀 教授 江口 保暢

論文内容の要旨

1907年 Harrison の神経線維の培養に始まる細胞培養は、近年、著しく進歩し、*in vitro*で培養細胞を用いて詳細な研究ができるようになった。

本論文の目的は、乳牛の卵巢からの顆粒層細胞 (GC) 及び黄体由来細胞 (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、さらに GC, LC の培養液中に性腺刺激ホルモン (GTH) やプロスタグランジン $F_2\alpha$ (PG $F_2\alpha$) を添加した場合にどのような態度を示すかを知ることであり、主な観察点としては、細胞の増殖状況や形態などの所見、併せて培養液中へのプロジェステロン、エストロジェン分泌状況の両者について検討を行ったものである。

実験材料ならびに方法；GC は、屠場材料及び発情期の生体の卵胞から注射器で直接採取し、LC は、屠場材料ではほぼ開花期に近い大きさの黄体由来で、これら両細胞の継代細胞、初代細胞を供試したが、一方、これとは別に黄体をスライスしたのもも供試した。

培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①を所定の濃度に溶解後、成雌牛及び新生仔牛血清を10%の割合に添加したもので、37°Cの孵卵器で静置培養した。

供試 GTH は、人絨毛性性腺刺激ホルモン (HCG)、妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMS)、プロラクチン (Prolactin)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) 等で、培養開始時に添加し、細胞の増殖状態を算定する時期は、同じ実験群の中でどれかが鏡検して、ほぼ培養瓶の底面全般に増殖したと見られる時期を選び、上澄はホルモン定量用として凍結保存し、一方、培養瓶に付着した細胞に対しては、一定操作を施して細胞数を算定した。

細胞の観察は、倒立位相差生物顕微鏡で、培養瓶の底面に発育増殖した生材料を速やかに観察するとともに、培養瓶内にあらかじめ入れておいたカバーガラスを適時とりだし、これに付着している細胞をギムザ及びメイ・グリュンワルドギムザ染色等を施して細胞の形態を観察した。

本研究の結果は、以下のとおりである。

1. GC, LC の細胞培養

増殖、形態等；GC, LC は、*in vitro* でよく増殖し、増殖した細胞は、上皮様形態を示し、継代培養も可

能である。

ホルモン産生；培養液中へのホルモン産生は、採取時の卵巢周期に最も影響されると思われる成績が得られた。

GCでは、発情期由来のものは、ちなみに Estradiol (E₂) ならびにプロゲステロン産生量の最高値は極めて高く、屠場材料のものと大差がみられた。なお、プロゲステロン産生量の高かったものは、GCの黄体細胞への機能的推移が示唆された。

LCでは、エストロジェンは辛うじて検出できる程度であり、プロゲステロン産生量が高かったが、GCにおけるような大きい変動はみられなかった。

2. GTHのGC, LCに対する反応

単独添加の場合；HCG, PMS, Prolactin, FSH, LHの各添加は、一般にGC, LCの發育増殖を促進し、とくにProlactinはHCG以上の作用がみられたが、PMSはGC, LCの増殖に対しては、明らかに抑制的に作用した。

ホルモン産生については、明瞭な結果は得られなかった。

混合添加の場合；増殖については、GC, LCとも本研究での添加範囲内では、GTH相互の協力作用は認められなかった。また、ホルモン産生についても明瞭な結果は得られなかった。

3. PGF₂αのGC, LCに対する反応

増殖；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。

ホルモン産生；GCでは、屠場材料のものに対しては、プロゲステロン産生を顕著に促進したが、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、プロゲステロン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、in vitroにおける所見が必ずしも in vivo で観察される臨床的反応とは一致しない現象も確認され、in vivo での複数の因子による性機能の運営等が示唆される結果も得られる等、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。

論文審査の結果の要旨

生活体における卵巢は主として上位からの指令によって反応し、一方、上位に対してはいわゆるフィードバック現象により相互の調整をとりながら周期的なリズムを形成している。

卵巢における卵胞の動きを形態学的にみると性腺刺激ホルモン(GTH)が減少した場合は卵胞の發育は中止され、組織学的にみても卵胞膜細胞はその増殖を停止しているように思われる。

卵胞膜細胞のみならず、黄体においても、その發育は一定限界で停止する。これらの現象は増殖を促進するGTHの減少によるものとして理解されているようである。

また、卵巢におけるステロイドホルモンの産生や分泌に関しても、血中のホルモン量を測定し、その機能を推察する場合が多く、この面における詳細な検討も必要と考えられる。

著者はこれらのことに鑑み、卵巢の機能を解析的に検討するため、とりあえず、顆粒層細胞(GC)や黄体

細胞 (LC) を *in vitro* で培養し、支配系からきり離れた場合の各細胞の示す形態的並びに機能的な態度を知ることにより、卵巣機能の一端を明らかにするため、この実験を行なったものである。

観察の対象としたものは、GC、LC、及びそれらが分泌する estrogens (E_1 , E_2 , E_3), progesterone であり、それらが培養中に示す所見についての分析を試みている。

顆粒層細胞は屠場材料のものや生体からのバイオプシーによるもの、黄体細胞は屠場材料を主に用いている。

細胞の培養は一般的常法に従って実施しており、ホルモン測定はRIAによった。

実験の順序として先ずGTHフリーの場合、GTH添加の場合、プロスタグランジン $F_2\alpha$ 添加の場合等について、細胞増殖、ステロイドホルモン分泌に及ぼす影響を観察し、今まで報告されていない現象もかなり認知している。

実験成績の要点を述べると、GC、LC、とも培地中で容易に増殖すること、培地中へのGTHの添加により、その増殖は一般に促進されること、培地中へのホルモン産生も認められることなど、*in vivo* での現象を裏付ける所見が多く得られた。

しかし、雌牛に対し、Prolactinを投与した場合の卵巣に対する反応は極めて曖昧なのに反し、培養細胞に対しては増殖、ホルモン産生ともに著明な促進作用が見られたこと、また、妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMS)は生体に投与すれば極めて強い卵胞の発育を起し、発情を招来さすが、*in vitro* ではGCの増殖ははっきりと抑制される現象が観察されている。

また、生体に投与した場合、顕著な黄体退行作用並びにProgesteroneの分泌抑制効果のある $PGF_2\alpha$ に対し、*in vitro* ではGC、LCとも目立った影響はうけず、LCは返って発育を促進される所見が見られ、培養細胞のみならず、黄体のスライスしたものに対しても、ホルモン産生は抑制されなかった。これらのことは、生体内では $PGF_2\alpha$ の他に何らかの協関因子のあることが示唆される。

また、GCやLCを採取する場合、生前における生体の卵巣周期のちがいによっても *in vitro* 実験の結果に影響を与えるのではないかの考えのもとに、自然の各周期のもの、人為的にGTHを投与して発情を起させたもの等についてGCの培養所見を検討の結果、個々の細胞に分離されて培養された場合でも生体内で享受していたGTHの影響が持続しており、発情時のものは非発情時のものの数十倍あるいはそれ以上のestrogensの分泌量を示すこと等が認められた。

その他、詳細な現象にも興味ある所見が得られているが、これらの手法やそれによって得られた結果は獣医学分野における繁殖領域においては、過去、目立った報告はほとんどみられず、最近医学関係での報告が多少なされている程度である。

以上のとおり、この論文は繁殖面における各種の研究を行なう上に斬新的な手法を提示したものであり、また、今回確認された新しい事実も価値のあるものであり、その内容から見ても牛の繁殖生理面を検討する場合に貢献できるものと思われ、獣医学博士を授与するに値するものとして高く評価する。