

学位申請論文

「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——

(主論文要旨)

川 上 静 夫

麻布大学獣医学部繁殖学教室

(主任 大地隆温教授)

主論文要旨

1907年 Harrisonの神経線維の培養に始まる細胞培養は、近年、著るしく進歩し、*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、乳牛の卵巣からの顆粒層細胞 (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、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 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) 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℃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・グリー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、採取時の卵巣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)ならびにプロジェ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、プロジェ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、プロジェ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の発育増殖を促進し、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、PGF_{2α} 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，プロジェ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，明瞭な傾向は把握できなかった。エストロゲン産生は，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，プロジェステロンを促進するような傾向がみられた。エストロゲン産生については，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。