

ヒト卵巣莢膜細胞層の単層細胞培養法

—その形態学的・機能的研究—

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

片山恵利子

Monolayer Culture of Human Ovarian Thecal Cells
—A Study on Morphological and Functional Characteristics—

Eriko KATAYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

(Director: Prof. Rihachi Iizuka)

概要 従来主に組織片培養系を用いて研究されてきたヒト卵巣莢膜細胞層の単層細胞培養法を初めて確立し、培養細胞の形態学的特徴とステロイド分泌能を検討した。

正常ヒト卵巣より卵胞期後期に卵胞を採取し、莢膜細胞層を遊離後 collagenase 及び hyaluronidase にて処理し、得られた遊離細胞を10日間単層培養した。まず酵素処理前の莢膜組織の組織検査により、顆粒膜細胞の混入のないことを確認した。次いで組織化学法にて、培養細胞中に多数の脂質顆粒と 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β HSD) 活性を証明した。 3β HSD 活性は約60%の培養細胞に陽性であり、これは莢膜組織の steroid-secreting cell と fibroblastic cell の構成比にほぼ一致するものであった。

培養細胞の主要分泌ステロイドは Δ_4 -androstenedione (Δ_4) と progesterone (P) であり、 Δ_4 は培養早期に $31.6 \pm 1.9 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/2 \text{ days}$ と多量に分泌され、その後は減少した。一方 P は、中等量の分泌 ($9.0 \sim 21.3 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/2 \text{ days}$) が培養10日間を通じて保たれた。Estradiol の分泌は、非常に少量であった。

さらにステロイド分泌へのゴナドトロピンの影響を検討したところ、LH/HCG の添加により Δ_4 ・P の分泌は用量反応的に刺激され、LH 10ng/ml により約4倍、HCG 10ng/ml により約2倍に増加した。又、dibutyl cyclic AMP (Bu_2cAMP) によっても Δ_4 ・P の分泌は用量反応的に刺激され、 Bu_2cAMP 10^{-3} M において4.4倍に増加した。LH/HCG への反応性は培養開始後日数が経過すると低下したが、 Bu_2cAMP に対しては10日目まで反応が保たれた。

以上より、本法による培養莢膜細胞はステロイド分泌細胞であることが形態学的に証明され、機能的にも LH に支配された androgen 分泌という莢膜の in vivo での機能をとどめることが明らかにされた。従つて本培養系は、今後の莢膜の in vitro での研究に十分有用であると考えられる。

Synopsis The aim of this study was to establish a monolayer culture system for human ovarian thecal cells and to investigate their morphological and functional characteristics. Theca layers were isolated and digested with collagenase-hyaluronidase solution, and dispersed thecal cells were cultured for 10 days in plastic dishes. Histological examination indicated that there were no contaminating granulosa cells in isolated theca layers. Various histochemical studies revealed abundant lipid droplets and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured cells.

The major steroids secreted were Δ_4 -androstenedione (Δ_4) and progesterone (P). Δ_4 secretion was very high during the first 2 days ($31.6 \pm 1.9 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/2 \text{ days}$) and declined thereafter. P was secreted in moderate amounts throughout the 10 day culture period ($9.0 \sim 21.3 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/2 \text{ days}$), while estradiol secretion was very low. Subsequently, the responsiveness of cultured thecal cells to gonadotropins and dibutyl cyclic AMP (Bu_2cAMP) was investigated. LH/HCG and Bu_2cAMP stimulated Δ_4 and P secretion in a dose-related manner. The maximal effective doses of LH and HCG were both 10ng/ml, and that of Bu_2cAMP was 10^{-3} M .

In conclusion, it was evident that these monolayer-cultured human thecal cells could maintain their morpho-functional characteristics during culture. Therefore, this culture system will provide an excellent model for further studies on the functional properties of thecal cells.

Key words: Thecal cells • Culture • Human • Steroids

結 言

卵巢機能の解明には、卵巢の各構成成分毎に生理的役割を検討することが不可欠である。このうち顆粒膜細胞層や黄体については、近年数多くの知見が集積されてきたが、莢膜細胞層については、未だ明らかにされていない点が多い。これは、莢膜組織の遊離の難しいこと、組織量の少ないこと、等に起因すると考えられ、又、現在まで報告されている研究のほとんどが莢膜組織片培養系を用いたものであり¹⁾³⁾¹³⁾¹⁸⁾、単層細胞培養系を用いた研究は、プタで Stoklosowa et al.¹⁶⁾¹⁷⁾と Barbieri et al.²⁾が報告しているのみである。

今回、著者らはヒト卵巢莢膜細胞の単層培養系を確立し、形態面・機能面の双方から基礎的検討を加えたので報告する。

実験材料ならびに方法

1. 対象

正常月経周期を有する35例の婦人の卵胞期後期(排卵期を除く)に行なわれた婦人科開腹手術の際に得られた卵巢の一部を検体として用いた。年齢分布は25～42歳で、疾患は子宮筋腫・卵巢嚢腫・子宮頸部上皮内癌であり、手術3カ月以内にホルモン剤を投与されている例は除外した。

手術中に両側の卵巢を検索し、直径1cm以上(1.0～2.4cm)で、血行性に富み肉眼的にいわゆる主席卵胞と推定される卵胞をふくめて、卵巢を楔状に切除した。採取した検体はphosphate buffered saline (PBS) 中で無菌的に4℃にて保存し、3時間以内に実験に供した。

2. 莢膜細胞の培養方法

採取した卵巢楔状切除片より、卵胞をなるべく周囲間質を除きながら切り出し、卵胞液を吸引・保存後、卵胞を4分割し、実体顕微鏡下に卵胞壁最内面を占める顆粒膜細胞層を金属ループで搔爬して除去した。次いで眼科用小摂子にて顆粒膜除去後の卵胞壁内面、即ち莢膜細胞層を把持し、これを間質から剥ぎ取るようにして1枚の薄膜として莢膜層を遊離した。得られた莢膜組織の一部は、10%ホルマリンで固定し、後にHE染色に供した。

次に残りの莢膜層をPBSで洗浄した後1～2

mm³の小片に細切し、これをCollagenase (Type 1, Sigma) 0.2%・Hyaluronidase (Type 1-S, Sigma) 0.2%溶液にて30分間37℃で振盪消化し、終了後250×gで5分間遠沈、上清除去後沈殿細胞を10% Fetal calf serum (FCS) (GIBCO) 添加 Medium 199 (M 199) (阪大微生物病研究会)にて洗浄した。次いで4～10mlの既知量の10% FCS 添加 M 199を沈殿細胞に加えて、ピペッティングにより莢膜細胞浮遊液を作成し、この一部を0.4% trypan blue で生体染色した後、血球計算板で細胞数・細胞生存率を計算し、1 dish あたり生存細胞1×10⁵個の割合で、Falcon の tissue culture dish (35×10mm, #3001) に植え込んだ。

培養液としては、10% FCS添加M 199にGIBCO の Penicillin 100U/ml・Streptomycin 100μg/ml・Fungizone 2.5μg/mlを加えたものを用い、1 dish あたり2ml とした。培養は37.0℃、95% air-5% CO₂ の下で行ない、特に示さない限り2日毎に培養液を全量交換して10日目まで培養した。培養液はステロイド濃度測定のため-20℃にて凍結保存した。

又、添加試薬として、NIADDK より提供された human LH-I-2 (AFP-6332-B, 13117IU/mg), human FSH-2 (AFP-2844-B, 5226IU/mg), 帝国臓器より提供された HCG (lot 36H-2-H, 13676 IU/mg), 第一製薬より提供された dibutyryl cyclic AMP を使用した。

3. 培養莢膜細胞の形態学的観察

培養細胞は倒立位相差顕微鏡にて適宜観察し、さらに一部の細胞をLabtek tissue culture chamber/slide (#4804) 上で培養して、下記の組織化学的検査を行なった。

(i) Oil Red O脂肪染色

10%ホルマリンで30分固定後、Oil Red Oで10分、対染色としてHematoxylinで3分染色した。

(ii) 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase (3β HSD) 活性

Dehydroepiandrosterone を基質として用い、Levy et al.¹¹⁾の方法に従って行なった。

4. ステロイド測定法

培養液中に放出された estradiol (E₂), proges-

terone (P), Δ_4 -androstenedione (Δ_4), testosterone (T), dehydroepiandrosterone (DHEA) の濃度を radioimmunoassay¹⁰⁾にて測定した。

5. 統計的処理

有意差の検定は, Student の t 検定, 又は一元配置法と Duncan の multiple range test にて行ない, $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

実験成績

1. 組織学的検査

莢膜組織への顆粒膜細胞・間質の混入の有無を調べるため, 実験の都度, 莢膜組織の一部を HE 染色に供したが, 図 1 の如く, 標本はすべて莢膜内・外層のみよりなり, 顆粒膜・間質の混入を認めなかった。

2. 培養莢膜細胞の形態の基礎的観察

莢膜組織は本法による酵素処理によつてほぼ完全に個々の細胞に分離され, 1 個の卵胞より採取

できた莢膜細胞数は, $15.4 \pm 2.3 \times 10^5$ 個 ($M \pm SEM$, 以下同様) ($6.0 \sim 32.0 \times 10^5$ 個)であり, 遊離細胞浮遊液作成時の trypan blue 生体染色による生存率は, $70.8 \pm 2.8\%$ であつた。

培養細胞は, 主に線維芽細胞様, 一部上皮細胞様の発育形態を示し (図 2), 1 dish あたり 1×10^5 個ずつ植えられた細胞は, 2 日目に $0.72 \pm 0.16 \times 10^5$ 個と減少した後増殖を続け, 8~10 日目に confluent の状態に達し, 10 日目の細胞数は $1.80 \pm 0.30 \times 10^5$ 個であつた (図 3)。

一部の実験において10日目毎に細胞を継代培養したが, 培養細胞は少なくとも35日目まで生存を示した。

3. 組織化学的検索

(i) Oil Red O 脂肪染色 (図 4)

Oil Red O による脂肪染色では, 培養細胞の細

図 1 酵素処理前の莢膜組織 (HE 染色, 200 $\times$)

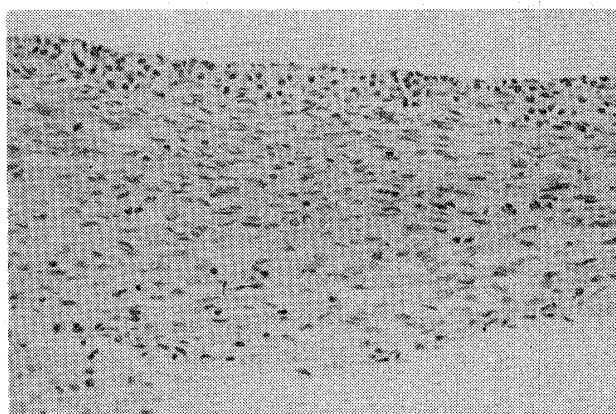


図 2 培養10日目の莢膜細胞 (100 $\times$)

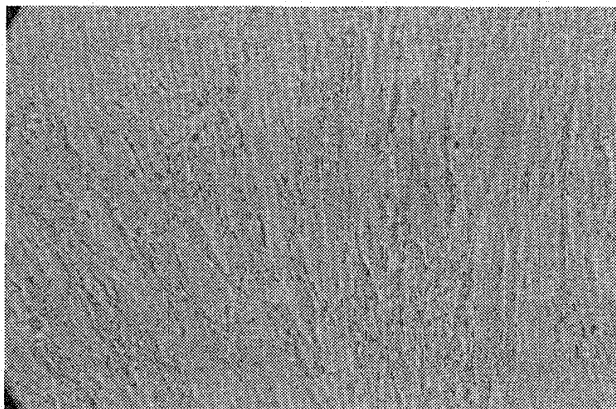


図 3 Growth curve of cultured thecal cells

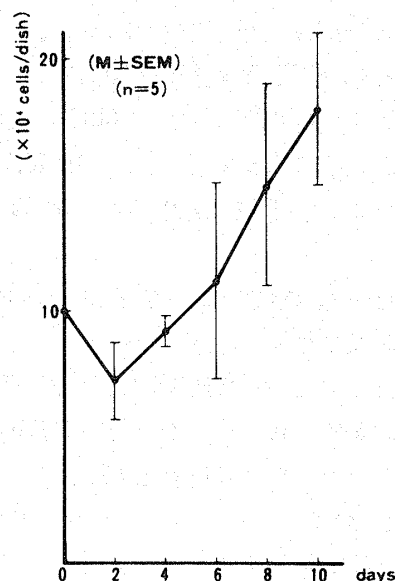


図 4 Oil Red O 脂肪染色 (7 日目, 400 $\times$)

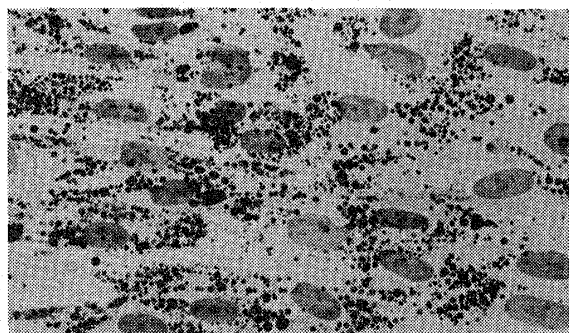
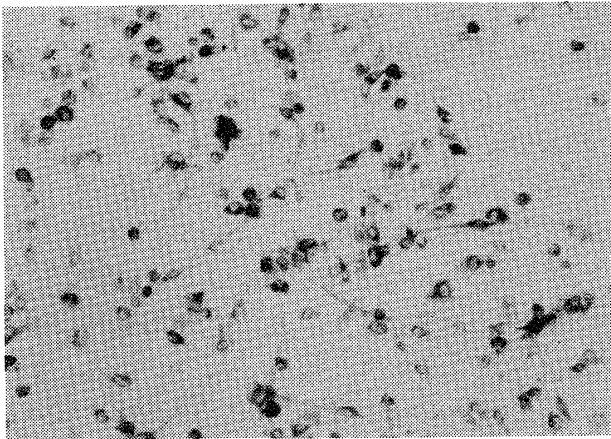


図5 3β HSD 活性 (1日目, 100 $\times$)

胞質中に多数の脂質顆粒を認めた。

(ii) 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3β HSD) 活性 (図5)

Dehydroepiandrosterone を基質として用いた酵素組織化学法で、培養莢膜細胞に強い formazan 沈着、即ち 3β HSD 活性を認めた。培養莢膜細胞中の 3β HSD 活性は均一ではなく、 3β HSD 陽性細胞と 3β HSD 陰性細胞が混在したため、任意に選んだ3つの視野で、各々100個の細胞について 3β HSD 活性の有無を数えて、 3β HSD 陽性率を算定したが、3回の培養での平均値が59.7 $\pm$ 2.6%であった。

4. 培養液の基礎的検討、並びに、対照としての子宮筋腫由来の細胞の培養

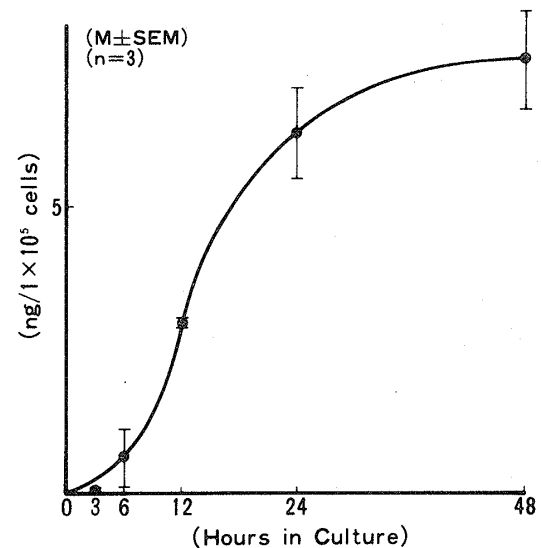
培養液として用いた10%FCS添加 M 199中のホルモン濃度は、 $E_2 \cdot P \cdot \Delta_4 \cdot T \cdot DHEA$ の各ステロイドについては100pg/ml 以下、又、LH $\cdot$ FSH $\cdot$ PRL のゴナドトロピンについては1.9 mIU/ml 以下であった。

また、対照として子宮筋腫の組織の一部を莢膜と同じ方法で酵素処理して得られた細胞を、莢膜細胞と同一条件下で10日間培養し、2日毎に培養液中に放出されたステロイドの量を測定したが、 $\Delta_4 \cdot E_2 \cdot P$ 共に今回の培養実験で測定限界とした400pg/ 1×10^5 cells/2days 以下であった。

5. 培養莢膜細胞のステロイド基礎分泌

(i) 経時的变化

培養開始後48時間の培養液への Δ_4 の分泌を測定してみると、図6に示したように24時間まで時

図6 Cumulative Δ_4 secretion during the first 2 days of culture

間と共に増加し、その後次第に減速し、48時間でプラトーに達した。従つて諸種ホルモン非添加時の莢膜細胞の $\Delta_4 \cdot T \cdot DHEA \cdot P \cdot E_2$ の分泌の動態を、2日毎に培養液を交換して調べることにした。

尚、1回の実験は1個の卵胞より採れた莢膜細胞で duplicate 又は triplicate で行ない、5回の反復実験の M $\pm$ SEM を算出した。

(ii) Δ_4 -androstenedione (Δ_4) (図7)

Δ_4 は培養早期に大量に分泌され(2日目: 31.6 $\pm$ 1.9ng/ 1×10^5 cells/2days), その後急激に減少し、4日目に3.1 $\pm$ 0.6ng/ 1×10^5 cells/2daysで、6日目以降は測定限界の400pg/ 1×10^5 cells/2days 以下であった。尚、2日目と4日目の間に有意差を認めた。

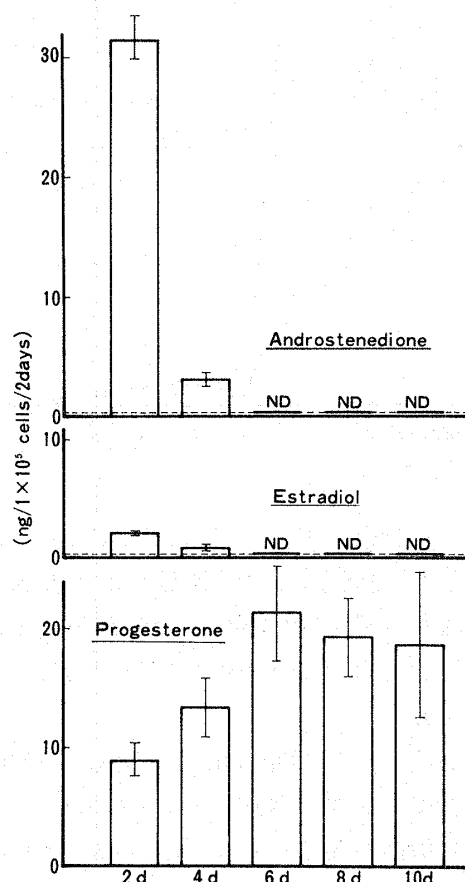
(iii) Estradiol (E_2) (図7)

莢膜細胞による E_2 の分泌は、 $\Delta_4 \cdot P$ と比べて非常に少なく、又、 Δ_4 と同じく漸減傾向を示した。2日目2.1 $\pm$ 0.2ng/ 1×10^5 cells/2days, 4日目1.0 $\pm$ 0.2ng/ 1×10^5 cells/2days, 6日目以降は測定限界以下であり、2日目と4日目の間に有意差を認めた。

(iv) Progesterone (P) (図7)

莢膜細胞によるPの分泌は、2日目9.0 $\pm$ 1.4ng/ 1×10^5 cells/2daysと中等量を示したあと次第に上昇し(4日目: 13.4 $\pm$ 2.5ng/ 1×10^5 cells/2

図7 Various steroids secreted by cultured thecal cells
(ND=non-detectable)



days), 6 日目に $21.3 \pm 4.0 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/2 \text{ days}$ で, 6 日目以降10日目まではほぼ横ばいであった。2 日目と 6, 8, 10 日目, 4 日目と 6 日目の間にそれぞれ有意差を認めた。

(v) Testosterone (T)

T の分泌量は, 培養10日間を通じて $400 \text{ pg}/1 \times 10^5 \text{ cells}/2 \text{ days}$ 以下であった。

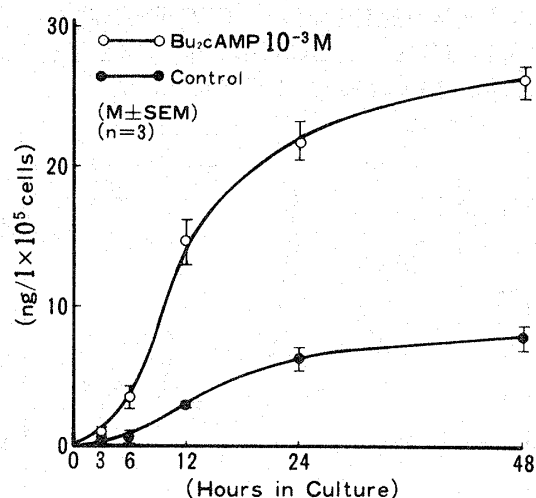
(vi) Dehydroepiandrosterone (DHEA)

DHEA の分泌は, E_2 と同様の傾向を示し, 2 日目に $2.0 \pm 0.01 \text{ ng}/1 \times 10^5 \text{ cells}/2 \text{ days}$ で, 以後漸減した。

6. ギナドトロピン, 並びに, dibutyl cyclic AMP 添加実験

培養莖膜細胞の諸種のギナドトロピン並びに cyclic AMP に対する反応性を調べるため, human LH・human FSH・HCG と, 細胞膜を通過しうる cyclic AMP 誘導体である dibutyl

図8 Cumulative Δ_4 secretion during the first 2 days of culture with or without Bu_2cAMP (10^{-3} M)



cyclic AMP (Bu_2cAMP) を培養液に添加してステロイド分泌への影響をみた。

(i) 経時的变化

Incubation time を決めるため, $\text{Bu}_2\text{cAMP } 10^{-3} \text{ M}$ 添加及び非添加の場合の, 培養開始後48時間までの Δ_4 の分泌を測定したところ, 図8のように3時間目より両群の間に著明な差を認め始め, 時間と共に両群の差は拡大した。しかし24時間以降は次第にプラトーに達し, 両群の差の拡大をほとんど認めなかった。従つて培養開始後24時間の incubation で, 各ギナドトロピン ($1 \sim 1,000 \text{ ng/ml}$) と Bu_2cAMP ($10^{-7} \sim 10^{-2} \text{ M}$) の用量-反応曲線を求め, 次いで最大有効濃度を添加して10日間培養して, 1, 2, 4, 6, 8, 10 日目にステロイド分泌量を調べて各ホルモンの作用の経日的変化をみるとした。

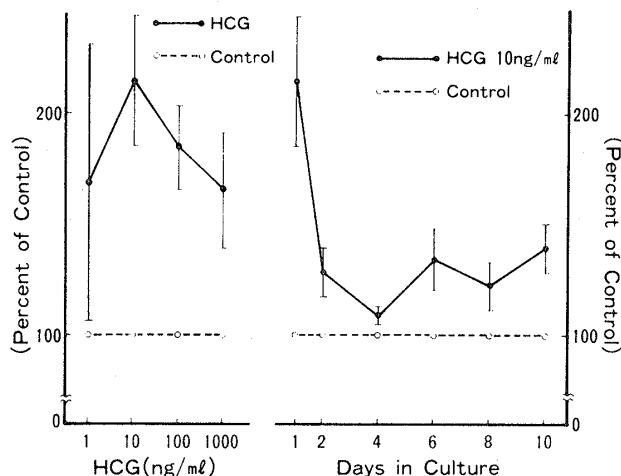
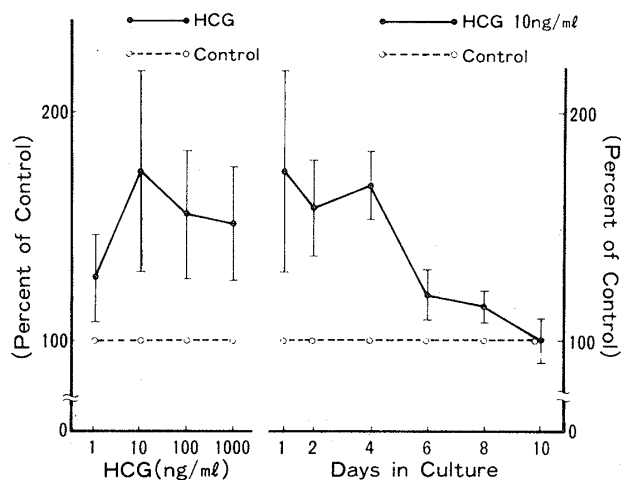
尚, 実験はそれぞれ duplicate の培養を 3 回ずつ反復して行なつたが, 個体差による各3回の反復実験間の絶対値のバラつきのため, 対照に対するパーセント値を用いて $M \pm \text{SEM}$ を算出した。この際, 各反復実験間における添加ホルモンの作用の傾向は同一であつた。

(ii) LH/HCG

HCG を $1 \sim 1,000 \text{ ng/ml}$ の濃度の範囲で培養液に添加して24時間培養した場合の $\Delta_4 \cdot P \cdot E_2$ の分泌の変化を調べてみると, HCG は Δ_4 と P の分泌

図9 Effect of HCG on Δ_4 secretion

左に HCG (1~1,000ng/ml) と Δ_4 分泌 (24時間) の用量反応曲線, 右に HCG 10ng/ml の Δ_4 分泌への効果の経日的変化を示す. HCG 非添加時の Δ_4 分泌量を100%として, HCG 添加時の Δ_4 分泌量を%値で表示, 3 回の実験の $M \pm SEM$ である.

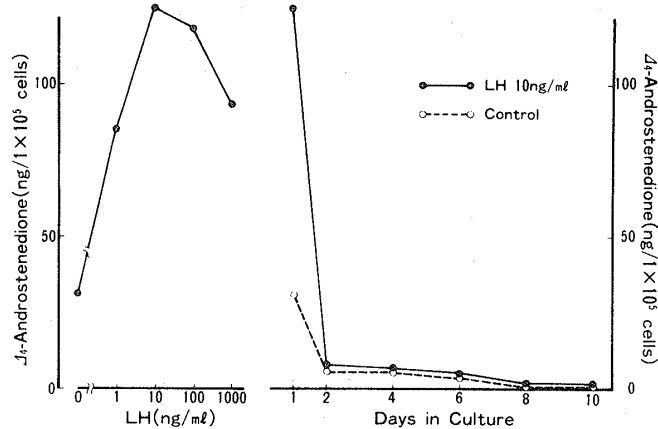
図10 Effect of HCG on P secretion
P分泌について, 図9と同様に表示した.

に対し1ng/mlで刺激的に作用し始め, 10ng/mlで最大刺激を与え, 対照(HCG 非添加)に比し Δ_4 分泌を 2.14 ± 0.29 倍, P分泌を 1.74 ± 0.44 倍に増加せしめた (図9, 10). さらに100ng/ml, 1,000ng/mlにおいても, HCGは Δ_4 とPに対し刺激効果を示した. 尚, E_2 分泌に対しては, HCGは一定の効果を示さなかつた.

次いで HCG 10ng/ml を添加して莢膜細胞を10日間培養して, HCGによる Δ_4 ・P分泌の刺激の経日的変化をみてみると, Δ_4 への刺激は1日目

図11 Effect of LH on Δ_4 secretion

左に用量反応曲線, 右に LH 10ng/ml の効果の経日的変化を示す. 代表的実験例における成績である.



み著明 (2.14倍) で, 2日目以降は1.09~1.39倍に低下した (図9). また HCG の P への刺激は4日目まで1日目と同程度に保たれたが (4日目: 1.68倍), 6日目以降はやはり1.0~1.2倍と低下した (図10).

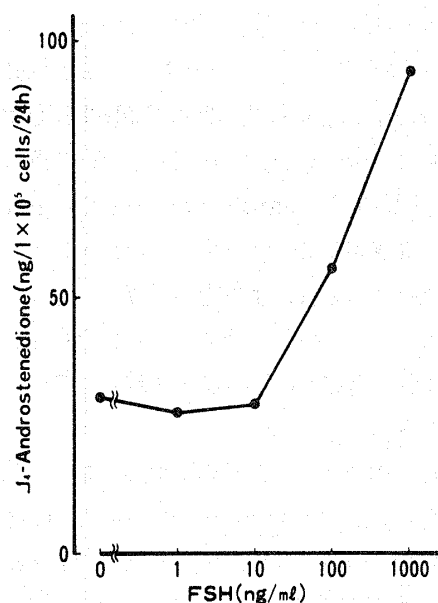
次に LH (1~1,000ng/ml) の培養24時間のステロイド分泌に対する効果を調べてみると, HCGと同一の傾向が認められた. 即ち, Δ_4 とPの分泌に対し刺激的に作用し, 最大有効濃度はHCGと同じく10ng/mlで, この濃度において Δ_4 分泌4.06倍, P分泌2.79倍であった (図11).

LH 10ng/ml の効果の経日的変化も HCG と同様の傾向を示し, Δ_4 への刺激は1日目のみ4.06倍と高く, 2日目以降は1.28~1.59倍に低下した (図11). Pに対しては, 2.05~2.10倍と1日目よりやや低い刺激が10日目まで続いた.

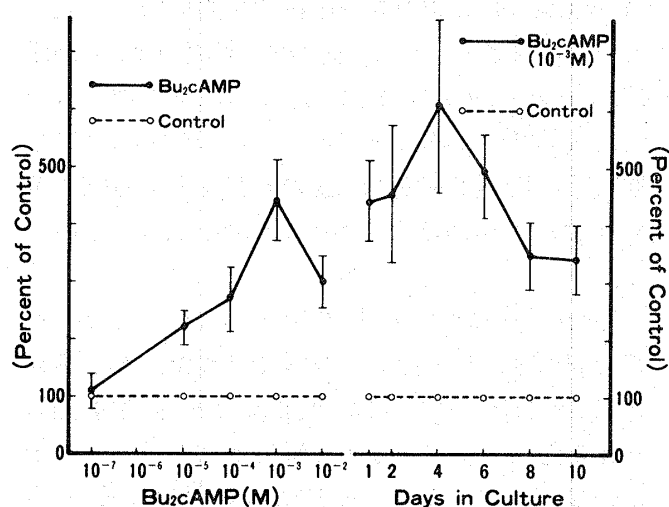
(iii) FSH

1~1,000ng/ml の範囲で FSH の効果をみてみると, Δ_4 とPの分泌に対して高濃度で刺激的に作用した. 即ち, 10ng/ml 以下では効果を示さず, 100ng/ml で Δ_4 分泌を1.8倍, 1,000ng/ml で3.0倍に増加せしめた (図12). P分泌は1,000ng/ml で2.9倍であった. 一方 FSH は E_2 分泌には影響を与えなかつた.

次に Δ_4 ・P分泌に対する効果の経日的変化をみてみると, FSH 1,000ng/ml により刺激作用のあるのは1日目のみで2日目以降は全く刺激を示さ

図12 Dose-response between FSH and Δ_4 secretion図13 Effect of Bu₂cAMP on Δ_4 secretion

左に用量反応曲線, 右に Bu₂cAMP 10⁻³M の効果の経日的変化を示す. Bu₂cAMP 非添加時の Δ_4 分泌量を100%とし, 図9と同様に%値で表示した.



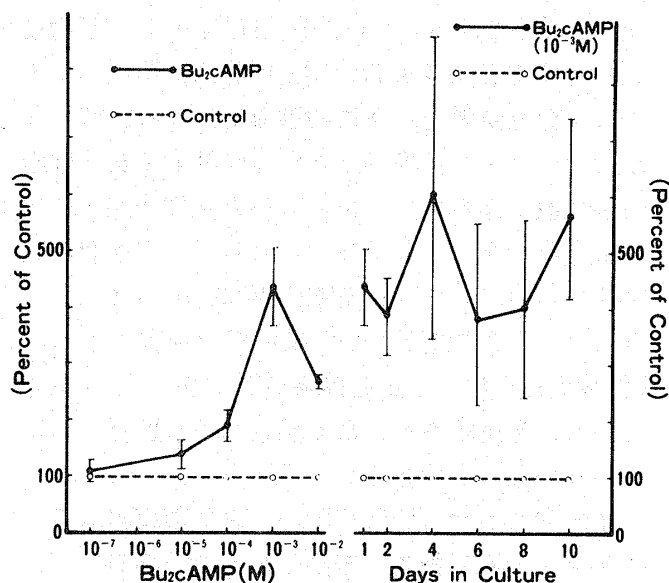
ず, 4日目以降むしろ抑制的に作用する傾向が認められた.

(iv) Dibutyl cyclic AMP (Bu₂cAMP)

10⁻⁷~10⁻²M の濃度の範囲で Bu₂cAMP の培養24時間のステロイド分泌に及ぼす効果を調べてみると, Bu₂cAMP は用量反応的に Δ_4 と P の分泌を刺激した(図13, 14). 即ち, 10⁻⁵M から刺激効果を示し始め, 最大有効濃度は10⁻³M で Δ_4 分泌を4.4±0.8倍, P分泌を4.4±0.7倍に増加せし

図14 Effect of Bu₂cAMP on P secretion

P分泌について図13と同様に表示した.



めた. E₂ に対しては一定の効果を示さなかった.

次いで Bu₂cAMP 10⁻³M の効果の経日的変化をみると, Δ_4 分泌への刺激は2日目4.5倍, 4日目6.1倍で, 8日目以降やや低下傾向を示すものの, 10日目においても3.4倍と明らかな刺激効果が保たれていた(図13). またP分泌に対しても, 3.9~6.1倍の範囲で10日間にわたりほぼ横ばい状態で刺激効果が保たれていた(図14).

考 案

卵巣機能の解明のためには, in vivo における研究と共に, in vitro において各卵巣構成成分毎にその機能を調べるのが重要である. 特にヒトにおいては, 倫理上 in vivo での研究には多大な制約が課せられているため, in vitro の実験系の確立が不可欠となる. 本研究は著者の検索した限りヒトにおいて初めて卵巣莢膜細胞層を単層培養したものであり, 先に述べたヒトにおける in vitro の実験系という観点からみて非常に意義深いものであると考える.

従来, 卵巣莢膜層の研究には組織片培養系が用いられるのが通例であり, いくつかの知見が報告されている¹⁾⁴⁾¹³⁾¹⁸⁾. この組織片培養系と今回用いた単層培養系の長所・短所を比較してみると, まず単層培養系が組織片培養系に優る点として, ①単層系の方が, dish 1個あたりの細胞数をより正

確に一定に保てる, ② 薬物を添加した場合に, 組織片系では組織中心部と周辺で濃度勾配を生じるが, 単層系では生じない, ③ 単層系の方が薬物効果に対する感受性が高い, ④ 単層系においてはホルモン分泌量等を, 単位細胞数あたりの数値で表現できるため, 莢膜細胞と顆粒膜細胞・黄体細胞との比較, あるいは, 正常卵巣と各種病態との比較に有利である, 等が挙げられる. 一方単層培養系が劣る点として, ① 組織片培養系に比して, より *in vivo* より遠ざかった環境での培養である, ② 酵素処理により細胞傷害が起こりうる, 等が考えられ, 単層培養を行なう場合に常に留意せねばならない問題点である.

本研究における培養細胞が, 真に莢膜組織中のステロイド産生細胞を培養したものであるかどうかを調べるため, いくつかの形態学的検討を加えた. まず Oil Red O 脂肪染色で多数の脂質顆粒が証明され, 培養細胞のステロイド産生能が示唆された. 次いで Levy et al.¹¹⁾の方法により, 培養細胞中に, ステロイド産生細胞に特異的である 3β HSD 活性が証明され, 本法による培養細胞はステロイド産生能を有する細胞であると結論することができた. 尚, 培養細胞には 3β HSD 陽性細胞と陰性細胞の両方が混在し, 3β HSD 陽性率は約 60% であつた. Hiura et al. は電顕を用いた研究⁹⁾において, “ヒトの内莢膜層は, (1) fibroblast-like cells, (2) theca gland cells, (3) transitional cells の 3 型の細胞よりなり, 外莢膜層は主に (1) よりなる. Graafian follicle の内莢膜層において 3 型の占める割合は, (1) : (2) : (3) = 26 : 44 : 30 であり, ステロイド分泌能を有するのは (2) と (3) である.”と述べている. 今回の培養細胞が, 莢膜内・外層を *disperse* したものであることを考えると, 60% の 3β HSD 陽性率は, 莢膜組織中の cell population を良く反映していると思われる.

形態学的観察に次いで, 培養莢膜細胞のステロイド分泌能を基礎ステロイド分泌とゴナドトロピンへの反応性の 2 つの観点から検討した. その結果, 培養莢膜細胞は多量の Δ_4 と中等量の P を分泌し, この Δ_4 と P の分泌は, LH/HCG と Bu_2cAMP によつて刺激されることが明らかになつ

た. この知見は, 1970 年代半ばより, まず実験動物において明らかにされ⁷⁾⁽⁸⁾⁽¹²⁾, 次いでヒト¹⁸⁾においても認められたいわゆる “two-cell, two-gonadotropin theory”, 即ち莢膜細胞層は LH の支配の下に androgen を分泌し, 顆粒膜細胞層は FSH の支配の下に androgen を estrogen に変換するという通説に概ね一致するものである (P の分泌については後に考察を加えた). 従つて培養莢膜細胞は, ステロイド分泌能の点でも *in vivo* での莢膜細胞の機能をそのまま維持していることが明らかにされた.

次に個々のステロイドの分泌について考察を加えてみると, まず androgen については, 培養莢膜細胞は多量の Δ_4 を分泌し, その 2 日目における分泌量は今回測定した 5 種のステロイド中最大であつたが, 一方, Δ_4 の分泌は短命で, 48 時間以降は急激に減少した. 莢膜が Δ_4 を分泌することは先に述べたように諸家の見解の一致をみているが, その分泌が短命であることもまた吉村¹⁾, McNatty et al.¹³⁾の莢膜組織片を用いての研究において観察されている. 従つて, 莢膜の Δ_4 分泌能は, *in vitro* の環境では急速に活性を失なうものであると推定することができ, このことは今後本培養系を用いて莢膜の機能の研究を進める際に常に念頭におかねばならない問題点であるといえる.

Estrogen については, 今回 E_2 を測定したが, その分泌は $\Delta_4 \cdot \text{P}$ に比して少量であつた. ヒト莢膜の E_2 産生能に関しては, 莢膜には E_2 産生能無しとする報告¹⁴⁾と有りとする報告³⁾⁽⁶⁾⁽¹³⁾とがあり, 未だ結論が出ていない. 一般に培養細胞の E_2 産生能を知るためには, 基礎分泌の他に $\Delta_4 \cdot \text{T}$ 等のいわゆる aromatizable androgen を基質として投与して aromatase 活性を測定することが必要であり¹⁴⁾, 本培養系を用いて莢膜の E_2 産生能に結論を出すためには今後さらに検討を加えねばならない.

P の分泌も興味あるパターンを示した. 即ち, *in vivo* での莢膜の P 産生は多くないと考えられるのに, 培養系では莢膜細胞は初期より中等量の P を分泌し, 6 日目まで増量した後横ばい状態で

10日目までP分泌を保つたのである。同様の傾向は、吉村¹⁾、McNatty et al.¹³⁾の莢膜組織片での研究でも認められている。一方、培養顆粒膜細胞においても相当量のPの分泌が長期持続することが知られており¹⁾、顆粒膜細胞の黄体化¹⁵⁾と呼ばれている。そこで著者らは、培養莢膜細胞によるPの分泌はin vivoにおけるP産生を反映するのではなく、むしろ“培養莢膜細胞の黄体化”とでも呼ぶべき現象が起こる結果であると推察している。莢膜細胞の黄体化がなぜ起こるのかについては、卵胞中に存在する黄体化を抑制する因子⁵⁾よりの解放、その他が考えられるが、今回の研究からは明らかでない。尚、本研究で混入顆粒膜細胞がPを分泌した可能性は、実験の都度、組織検査にて顆粒膜の混入を除外しているので否定的である。

ゴナドトロピンとcyclic AMP (cAMP)誘導体の添加実験では、LH/HCGとcAMPにより Δ_4 とPの分泌が刺激されることが明らかになった。さらにLH/HCGとcAMPの刺激効果の経日的変化をみてみると、LH/HCGの効果は、 Δ_4 に関しては1日目、Pに関しては4日目までのみ顕著であつたが、cAMPの刺激の効果は Δ_4 ・Pの双方に関して10日目まで維持された。これは培養細胞の細胞膜表面のLH/HCG receptorの機能が、本培養系では比較的早期に失なわれるが、LH/HCG receptor-adenylyl cyclase systemによつて賦活化される一連の系のうち、cAMPより後の系は培養後時間が経過してもintactであることを示唆するものと思われる。

FSHは、LH/HCGに比し高濃度(100ng/ml以上)で Δ_4 ・P分泌を刺激した。しかし今回用いたNIMDD-hFSH-2 (AFP 2844B)のbiopotencyは、FSH 3925IU/mg : LH 523IU/mgであり、約10%のLH activityの混入があるため、100ng/ml以上の濃度ではFSH中のLH activityにより刺激効果の発現する可能性があり、今回のデータのみで直ちに莢膜細胞がFSHにも反応すると結論することはできず、さらに検討を要する問題である。

以上を総括すると、今回報告した莢膜細胞単層培養系は、originである莢膜内外層とほぼ同じ比

率(60%)でステロイド分泌細胞を含むことが形態学的に証明され、またLHに支配されたandrogen分泌というin vivoでの莢膜層の機能をとどめることが明らかになった。そしてandrogen分泌とLHへの反応性は培養開始後時間が経過すると次第に失なわれ、一方Pの分泌が長期間維持されることも判明した。従つて本培養系は、今後莢膜細胞層のin vitroでの研究に十分有用であると考えられ、その際特に24時間程度の短期培養を重視する必要があると推察される。最後に、莢膜本来の機能の研究からは多少はずれるが、黄体化の機構の莢膜の立場からの検討に、本培養細胞の長期培養を応用しうるのではないかと考える。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師飯塚理八教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始御指導戴きました中村幸雄講師に深謝致します。更に貴重な御助言を戴きました今井重之博士と実験に協力戴きました慶応健康相談センター婦人科研究室橘川絹代嬢に感謝致します。検体採取に快く御協力下さいました荘病院、川崎市立病院、荻窪病院、済生会中央病院、国立埼玉病院の産婦人科の諸兄諸姉に深謝致します。さらに、hLH・hFSHを快く提供して戴きましたNational Institute of Child Health and Human Developmentに感謝致します。

本論文の要旨は、第55回日本内分泌学会秋季大会、第36回日本産科婦人科学会総会学術講演会、第7回国際内分泌学会(Quebec)にて発表した。本研究の一部は、文部省昭和56~58年度科学研究費補助金一般研究(B) No. 56480281、及び昭和58年度奨励研究A No. 58771096によるものであることを付記する。

文 献

1. 吉村泰典：組織培養法による顆粒膜細胞、莢膜組織のsteroidogenesisの研究—特に多嚢胞性卵巣症候群について—。日産婦誌，33：1005，1981。
2. Barbieri, R.L., Makris, A. and Ryan, K.J.: Effects of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. Fertil. Steril., 40: 237, 1983.
3. Batta, S.K., Wentz, A.C. and Channing, C.P.: Steroidogenesis by human ovarian cell types in culture: Influence of mixing of cell types and effect of added testosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 50: 274, 1980.
4. Channing, C.P.: Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. J. Endocr., 45: 297, 1969.

5. *Channing, C.P.*: Follicular non-steroidal regulators. In *Ovarian Follicular and Corpus Luteal Function*. (eds. Channing, Marsch, and Sadler), 327. Plenum Press, New York, 1979.
6. *Dennefors, B.L., Nilsson, L. and Hamberger, L.*: Steroid and adenosine 3',5'-monophosphate formation in granulosa and thecal cells from human preovulatory follicles in response to human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54: 436, 1982.
7. *Erikson, G.F. and Ryan, K.J.*: Stimulation of testosterone production in isolated rabbit thecal tissue by LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, $\text{PGF}_2\alpha$, and PGE_2 . *Endo.*, 99: 452, 1976.
8. *Fortune, J.E. and Armstrong, D.T.*: Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endo.*, 100: 1341, 1977.
9. *Hiura, M., Nogawa, T. and Fujiwara, A.*: Electron microscopy of cytodifferentiation and its subcellular steroidogenic sites in the theca cell of the human ovary. *Histochemistry*, 71: 269, 1981.
10. *Kasuga, Y.*: Ovarian steroidogenesis in Japanese patients with polycystic ovary syndrome. *Endocrinol. Japan.*, 27: 541, 1980.
11. *Levy, H., Deane, H.W. and Rubin, B.L.*: Visualization of steroid- 3β ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocr. Med.*, 65: 932, 1959.
12. *Makris, A. and Ryan, K.J.*: Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone, and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endo.*, 96: 694, 1975.
13. *McNatty, K.P., Makris, A., DeGrazia, C., Osathanondh, R. and Ryan, K.J.*: The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49: 687, 1979.
14. *Moon, Y.S., Tsang, B.K., Simpson, C. and Armstrong, D.T.*: 17β -estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: Stimulation by follicle-stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 263, 1978.
15. *Nicosia, S.V.*: Cytological analysis of in vivo and in vitro lutenization. In *Endocrine Physiopathology of the Ovary* (eds. R.I. Tozzini, G. Reeves and R.L. Pineda), 101. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980.
16. *Stoklosowa, S., Bahr, J. and Gregoraszczuk, E.*: Some morphological and functional characteristics of cells of the porcine theca interna in tissue culture. *Biol. Reprod.*, 19: 712, 1978.
17. *Stoklosowa, S., Gregoraszczuk, E. and Channing, C.P.*: Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 26: 943, 1982.
18. *Tsang, B.K., Armstrong, D.T. and Whitfield, J. F.*: Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 1407, 1980.

(特別掲載 No. 5472 昭59・3・19受付)