

無血清培養ブタ卵管上皮細胞における産生タンパク質の探求

湯原正高・中川 豊^{a)}

(家畜機能調節学講座)

Received June 15, 1992

An Investigation of Proteins Produced by Porcine Oviduct Epithelial Cells Cultured in a Serum-free Medium.

Masataka YUHARA and Yutaka NAKAGAWA^{a)}*(Department of Animal Science and Technology)*

The objective of the present study was to establish a serum-free culture system for porcine oviduct epithelial cells, and to investigate the proteins secreted by the cultured epithelial cells.

Epithelial cells separated from oviductal stroma by EDTA and collagenase treatment grew successfully in a serum-free culture medium composed of a 1:1 mixture of DMEM: Ham's F12 supplemented with insulin (10 µg/ml), transferrin (10 µg/ml), sodium selenite (25 ng/ml), hydrocortisone (100 ng/ml), retinol (10 ng/ml) and antibiotics. The cells grew to a confluent monolayer on the collagen gel within 6 days after seeding. The confluent monolayer state was maintained for at least 2 weeks. The epithelial nature of cultured cells was confirmed by transmission electron microscopic observation of desmosomes and microvilli.

A high viability (79.5%) was obtained in frozen-thawed cells when a serum-free medium containing 10% DMSO was supplemented with 0.1% methylcellulose.

The addition of 10^{-6} M 17β -estradiol (E_2) to the culture medium from day 6 to day 8 resulted in the extension of the culture term from 2 weeks to 3 weeks. However, analysis of the conditioned medium derived from cultured cells by SDS-PAGE revealed that no specific bands were observed by an addition of 10^{-5} ~ 10^{-10} M E_2 .

Porcine ampullary and isthmic epithelial cells were grown separately in a serum-free culture medium. Different protein bands were observed between the ampulla and isthmus after a SDS-PAGE analysis of the conditioned medium.

Cell growth activity in conditioned medium from ampullary and isthmic epithelial cells was assessed by a colony formation method in which one cell proliferates to form a colony. The colony formation rate in an assay medium from the ampullary and isthmic cells was 33% and 19%, respectively, while a colony formation rate of only 2% was observed in the control assay medium. The present study suggests that porcine oviduct synthesize and secrete specific proteins to stimulate cell growth, and that a difference in cell growth activity exists between the ampullary and isthmic regions.

a) 小野薬品工業株式会社 福井安全性研究所 (Fukui Institute for Safety, Ono Pharmaceutical Co., Ltd.)

緒 言

哺乳動物の卵管粘膜細胞は精子の輸送や受精能獲得の場であり、機能的にもこれらの現象に深くかかわっている。卵管粘膜上皮細胞から産生される高分子物質は初期胚の発育促進に関与するものとして注目され、性周期中の各時期および性ステロイドホルモンの影響下における卵管や子宮上皮細胞から産生されるタンパク質について研究が進められている。性周期の各時期の卵管外植片を短時間培養した場合に、発情期にのみ産生される卵管特異的糖タンパク質の存在することがブタ^{1,2)}とウシ³⁾について報告されている。さらに、卵管におけるエストロゲン依存性糖タンパク質の存在はエストロゲン処理したヒヒ¹⁸⁾とヒツジ³⁾から採取した卵管の培養によって立証されている。しかし、卵管の上皮細胞で産生されるこのような特異タンパク質の生理活性については明確にされていない。

一般に、哺乳動物の卵管・子宮粘膜細胞の培養には血清加培地が用いられているが、血清中には様々な生理活性物質—ホルモン、細胞増殖因子、細胞増殖抑制因子など—が含まれている。とくに、血清中には繊維芽成長因子が含まれ、血清加培地によって培養したハムスター卵管細胞は培養期間が長くなると繊維芽細胞が優勢になることが報告されている¹⁰⁾。これまで、卵管および子宮細胞を含めて数種の上皮細胞について無血清培養が行われているが、殆どの場合ウシ血清アルブミン (BSA) および上皮成長因子 (EGF) の両方またはいずれか一方が加えられている^{4,6,17)}。これらのことから、卵管および子宮上皮細胞から産生される特異タンパク質の同定と細胞増殖などの生理活性の研究には BSA や EGF を含まない無血清完全合成培地による培養法の確立が望まれる。また、卵管膨大部と峡部上皮細胞では形態的に異なることが知られているので、これらの細胞で産生される生理活性をもつ高分子物質が異なることも考えられる。

そこで、本研究ではまず、ブタの卵管上皮細胞の完全無血清培養と初代培養細胞の凍結保存について検討を行った。つぎに、この無血清培養法を用いて、ブタの卵管上皮細胞の形態と産生タンパク質に及ぼすエストロジェンの影響を調べた。さらに、卵管膨大部と卵管峡部の培養上皮細胞において産生される高分子物質の細胞増殖活性をコロニー形成法を用いて究明した。

材 料 と 方 法

1. ブタ卵管上皮細胞の採取：未成熟ブタ（初発情前）の卵管を食肉市場で採取し、供試まで抗生物質含生理食塩水中に保存した。卵管から脂肪および間膜組織などを除き、縦に切開後、約2 cmずつ横切りにした。卵管上皮細胞の剥離と分離方法は Inomata ら⁷⁾の方法を修正して行った。切開した卵管片を0.76% EDTA (Sigma) を含む Ca, Mg 不含リン酸緩衝液 (PBS(-)) で90分間処理後、卵管片の粘膜側を滅菌ピンセットで擦ることにより卵管粘膜組織を薄膜状に剥離した。さらに、0.1%のコラーゲナーゼ(255 U/ml, Sigma)を含むPBS(-)で37°C、30分間処理して細胞懸濁液を得た後、遠心分離による細胞洗浄を2回おこなった。洗浄後の一部の細胞懸濁液について、0.1%のクリスタルバイオレット (Sigma) 溶液で細胞核を染色し、トーマ血球計算板で細胞数を算出した。なお、この時点でのトリパンプル一排除試験による細胞生存率は90—95%であった。

無血清培養液：本研究には牛血清アルブミン (BSA) や上皮成長因子 (EGF) などを含まない次のような組成の無血清培地 (SFM) を用いた。DMEM/Ham's F12 (Sigma) を基本培地とし、これに10 μ g/mlインスリン、10 μ g/mlトランスフェリン、25 η M 亜セレン酸ナトリウム、100 η g/mlヒドロコルチゾン、10 η g/mlレチノール(以上 Sigma)、抗生物質として100

$\mu\text{g/ml}$ の硫酸ストレプトマイシン(明治製菓), $100\mu\text{g/ml}$ のペニシリンGカリウム(萬有製菓)を添加した。なお, 無血清培地の CaCl_2 濃度は生理的濃度とされている 1.05 mM とし, pHは7.1に調整した。

卵管上皮細胞の培養と観察: 細胞数と生存率を調べた残りの細胞を SFM で希釈して 35 mm 培養皿(Falcon)に 1×10^6 個ずつ播種した。培養は 37°C , $5\% \text{CO}_2$ - 95% 空気の条件下で行い, 培地の交換は2日毎とした。培地交換時に採取した培養上清の浮遊細胞等を遠心分離($350 \times \text{g}$, 10分間)によって除去し, 供試まで -35°C で保存した。培養細胞の観察は倒立型相差顕微鏡によって行った。また, 透過型電子顕微鏡を用いて培養8日目の細胞の微細構造を観察した。

培養細胞産生タンパク質の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE): 凍結保存培養上清を 37°C 温湯中で融解し, 遠心分離($10,000 \times \text{g}$, 30分間)後, 限外濾過(Centriprep-10, Amicon)により 10 KDa 以上の高分子画分を20倍に濃縮した。SDS-PAGEにはミニスラブ電気泳動装置(AE-6440型, ATTO)を用い, ポリアクリルアミド濃度は 7.5% を基本とし, 検索する分子量によっては 10% および 12.5% を使用した。泳動後のスラブゲルをOrkleyら¹¹⁾の方法に従って銀染色し, ゲルドライキット(Tefco)を用いて乾燥後, 出現した各タンパク質バンドを調べた。

卵管膨大部と峡部培養細胞の形態と産生タンパク質の解析: 未成熟ブタの卵管を膨大部と峡部に分け, それぞれについて前述の方法によって細胞を培養し, 分画した培養上清の電気泳動を行った。

2. 無血清培養ブタ卵管上皮細胞の凍結保存

凍結細胞の調整: 培養8日目の初代無血清培養細胞を PBS(-) で2回洗浄後, 0.05% トリプシン(Sigma) - 0.02% EDTA を含む PBS(-) で10分間処理し, 培養細胞を培養皿から剝離させた。さらに遠心分離($350 \times \text{g}$, 10分間)により3回洗浄した後, SFMに浮遊させ凍結用細胞懸濁液とした。

細胞の凍結: 細胞懸濁液に, 20% ジメルスルホキシド(DMSO, Sigma)を含む同量の SFM を段階的に加え, DMSOの最終濃度を 10% とした。さらに, 細胞膜保護物質として, メチルセルロース(MC, Sigma)あるいはBSA(Sigma)を 0.1% 添加した区と無添加区を設けた。凍害保護物質を添加した細胞懸濁液 0.5 ml (5×10^5 細胞/ml)をスリムチューブ(住友化学ベークライト)に入れ, プログラムフリーザー(OSK-3型, 大阪酸素)を用いて凍結を行った。室温から -5°C までを $2^\circ\text{C}/\text{min}$ の速度で冷却, -5°C で10分間保持, それ以降 -35°C までを1分間に 0.5°C , 2°C および 4°C で冷却し, その後 -160°C まで急冷して液体窒素(-196°C)中に保存した。凍結細胞の融解は 37°C の温湯中で行った。

3. ブタ卵管培養細胞の形態と産生タンパク質におよぼすエストロジェンの影響

前述の方法に従って未成熟ブタの卵管上皮細胞および子宮上皮細胞の無血清培養を行い, 培養8日目の細胞に $17\text{-}\beta$ エストラジオール(E_2 , Sigma)を 10^{-6} ~ 10^{-10} M 加え, 経時的に細胞形態を観察した。また, 10日目の培養上清を採取し, 限外濾過・濃縮後 SDS-電気泳動を行った。

4. 無血清培養ブタ卵管膨大部および峡部上皮細胞における産生高分子画分の細胞増殖活性

細胞活性検定培地の調整: ブタ卵管膨大部および峡部上皮細胞を無血清培地 SFM で6日間培養し, 培養6日目から8日目まで SFM からトランスフェリンを除いた培地で培養を行った。培養8日目に培養上清を採取し, 供試時まで -35°C で凍結保存した。保存培養上清は検定時に 37°C で融解し, 遠心分離($10,000 \times \text{g}$, 10分間)によって浮遊細胞等を除去後, 前述の限外濾過により分子量 10 KDa 以上の画分を20倍に濃縮した。細胞増殖活性の検定培地には

培養上清濃縮画分：DMEM/Ham's F12：子牛血清 (Sigma) を 1 : 17 : 2 の割合で混合したものを用いた。なお、卵管膨大部および峽部細胞の培養上清からの画分を含む検定培地をそれぞれ膨大部検定培地 (ACM) および峽部検定培地 (ICM) とした。対照培地 (CCM) には 10% 子牛血清添加 DMEM/Ham's F12 を用いた。

コロニー形成法による細胞増殖活性の検定：0.05% トリプシン, 0.02% EDTA を含む SFM で細胞を剥離・分散させ、洗浄後の細胞の一部についてトリパンブルー排除試験により生細胞数の算出を行った。検定培地 (ACM, ICM, CCM) 2 ml を 35 mm 培養皿に入れ、初代無血清培養卵管峽部上皮細胞を培養皿当たり 100 個ずつ播種した。培養は 37°C, 5% CO₂-95% 空気 の条件で 5 日間行い、5 日目の培養細胞をメタノール固定・ギムザ染色し、それぞれの検定培地を加えた培養皿についてコロニー数とコロニー当たりの細胞数を調べて検定培地中の細胞増殖活性を推定した。

結 果

1. 未成熟ブタ卵管上皮細胞の無血清培養

ブタ卵管上皮培養細胞の形態と増殖：播種した細胞は培養 24 時間後には培養皿底面に接着・伸展し、数百個の細胞からなるコロニーを形成した。その後、増殖を続け、培養 6 日目でコンフルエントの状態に達した。また、この頃から内部に液体を貯留した 3 次元構造の所謂ドームの形成も見られた。さらに、培養 8~10 日目には培養細胞は密集した蜂巢状を示した。培養 12 日目ころから細胞の扁平化の傾向が認められ、14 日以降には培養皿から細胞が剥離する場合も観察された。培養 4 日目には細胞数は播種時の 2 倍に達し、6 日目には培養皿当たり約 2.5 倍になり、10~12 日目までこの状態が保たれた。

培養細胞の透過型電子顕微鏡像には上皮細胞の特徴とされる微絨毛およびスポットデスモゾームが認められた (Fig. 1)。さらに、観察したすべての細胞に微絨毛がみられ、線維芽細胞の特徴の 1 つとされるコラーゲンデブリが全く観察されなかったことから本研究における培養細胞は上皮細胞であると判定された。

2. 無血清培養ブタ卵管上皮細胞の凍結保存

無血清培地 SFM に凍害保護物質として 10% DMSO を添加し、細胞の凍結保存において重要と考えられる -5°C から -35°C までの冷却速度を 0.5°C, 2.0°C および 4.0°C に設定した場合、-0.5°C/min の冷却速度でもっとも良好な結果が得られた (Table 1)。-5°C から -35°C までを 0.5°C/min で冷却した場合に、無血清培地 SFM に 10% DMSO だけを添加した対照区では融解後の細胞生存率 69.8% に対し、MC および BSA 添加区の生存率はそれぞれ 79.5% および 80.7% であった。また、毎分 2.0°C および 4.0°C の冷却速度においても、MC の添加によって融解後の細胞生存率の上昇が認められた。これらの結果から、無血清培養細胞の凍結保存において MC は一般に用いられている BSA に匹敵する保護効果をもっていることが示された。凍結細胞を融解後、再培養した細胞の増殖は良好で、培養

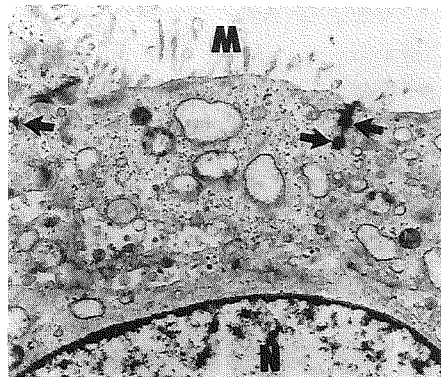


Fig. 1 Transmission electron micrograph of porcine epithelial cells cultured for 8 days in a serum-free medium. Note the presence of microvilli (M) and desmosomes (arrow); nucleus (N).

Table 1 Effects of cooling rate and supplements on cell viability after thawing

Supplement ^{a)}	Cooling rate ^{b)} (°C/min)	Viability after thawing ^{c)}
—	-0.5	69.8±9.6
MC	-0.5	79.5±3.8
BSA	-0.5	80.7±3.4
—	-2.0	29.1±9.8
MC	-2.0	56.3±6.1
—	-4.0	14.8±7.9
MC	-4.0	23.6±4.9

a) Medium for freezing : a serum-free medium containing 10% DMSO.

b) Cooling rate from -5°C to -35°C.

c) Values are mean ± SEM.

MC : 0.1% methylcellulose

BSA : 0.1% bovine serum albumin.

Primary cultured porcine oviductal cells dispersed by trypsin and EDTA were frozen in a program-freezer.

4～5日目にはコンフルーエントの状態に達し、10日間以上の培養が可能であった。

3. 無血清培養ブタ卵管上皮細胞の形態とタンパク質産生におよぼす E₂の影響

培養8日目の卵管上皮細胞に E₂10⁻⁶M を添加し、その後の形態を倒立位相差顕微鏡によって観察した。E₂無添加区の細胞は培養12日以降に扁平化が始まり、その後、培養皿底面からの剝離が認められた。一方、E₂添加細胞では12日以降も細胞の扁平化は認められず、新たにドームも形成され、約3週間密集した蜂巢状形態が観察された。この実験から、卵管上皮培養細胞において E₂は細胞の形態と培養期間に影響を与えることが明らかになり、E₂の刺激によって、細胞増殖にかかわる活性物質の産生が推察された。

卵管上皮培養細胞に対して、E₂を10⁻⁶、10⁻⁸、10⁻¹⁰M 添加した場合と無添加の場合について培養上清中の産生タンパク質の解析を SDS-PAGE で行った結果、電気泳動後の各タンパク質バンドには E₂添加の影響は認められず、E₂依存特異タンパク質の産生は明らかにできなかった。

4. ブタ卵管膨大部と峽部培養細胞の形態と産生タンパク質の解析

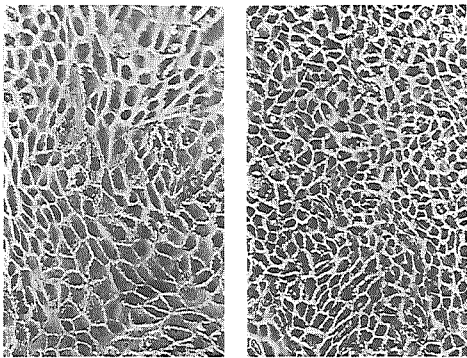
位相差顕微鏡観察では、培養開始後6日目までの細胞増殖期には卵管膨大部と峽部上皮細胞の間に形態的相違は殆ど認められず、両細胞とも典型的な上皮細胞形を示した。培養6日目以降の定常期に入ると峽部細胞は密集した蜂巢状となり、上皮様形態をよく維持したのに対し、膨大部細胞では扁平化する傾向が認められた。峽部細胞ではドームが形成された。なお、線毛細胞は膨大部細胞にのみ認められ、培養期間を通して活発な線毛運動が観察された。峽部培養上皮細胞は少なくとも3週間の培養が可能であったが、膨大部細胞では培養12日頃から細胞の扁平化が始まり、培養可能期間は約2週間であった。卵管膨大部および峽部の培養細胞に E₂10⁻⁷M を添加すると、いずれの細胞も良好な上皮様形態を示し、両細胞ともより長期間(3～4週間)の培養が可能であった (Fig. 2 と 3)。さらに培養10日目の卵管膨大部と峽部細胞の培養上清について SDS-電気泳動を行った結果、卵管膨大部では170 KDa および110 KDa のタンパクバンドが濃染され、峽部細胞では170 KDa, 130 KDa および45 KDa のバンドが強く検出された。

5. 無血清培養ブタ卵管膨大部および峽部上皮細胞における培養上清中高分子画分の細胞増殖活性

ACM, ICM および CCM で培養した継代卵管峽部上皮細胞のコロニー形成率を Table 2 に掲げる。ACM 区および ICM 区におけるコロニー形成率はそれぞれ33.6%、19.8%であ

り、両区とも10%血清培地 CCM 区の2.8%に対して有為に高かった。また、ACM 区と ICM 区の間にも有為差が認められ、細胞増殖活性物質の産生については卵管膨大部のほうに峡部に較べて高いことが示された。さらに、それぞれの区において、6回の細胞分裂を基準として、1つのコロニーが63個以下のコロニーと64個以上の細胞からなるコロニーが占める割合を求めた。ACM、ICM および CCM 区における64細胞以上のコロニーはそれぞれ62.5%、31.3%および7.1%であり、各区の間には有為差が認められた。

細胞増殖活性物質を含む培地によって1個の細胞から増殖して形成されたコロニーのギムザ染色像を Fig. 4 に示す。コロニー B と C および D はそれぞれ数十個および数百個の細胞か



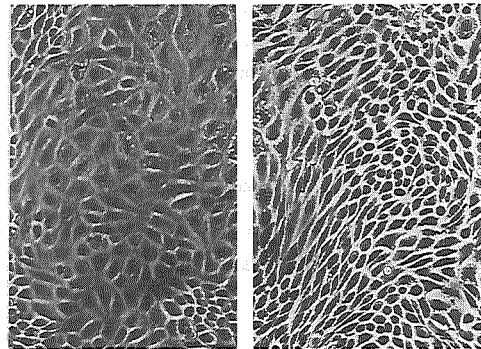
A B

Fig. 2 Hormonally induced morphological changes of cultured porcine isthmic epithelial cells.

E_2 ($10^{-7}M$) was added to the culture from day 8 to day 10, and cultured to day 14 in a serum-free medium.

A) Phase-contrast micrograph at day 14 in a serum-free culture.

B) Micrograph at day 14 in the same culture condition, except E_2 ($10^{-7}M$) was added to the culture from day 8 to day 10.



A B

Fig. 3 Hormonally induced morphological changes of cultured porcine ampullary epithelial cells.

E_2 ($10^{-7}M$) was added to the culture from day 8 to day 10, and cultured to day 14 in a serum-free medium.

A) Phase-contrast micrograph at day 14 in a serum-free culture.

B) Micrograph at day 14 in the same culture condition, except E_2 ($10^{-7}M$) was added to the culture from day 8 to day 10.

Table 2 Rate of colony formation by porcine isthmic epithelial cells in different culture media

Medium	Rate of cells forming a colony (%)
CCM	2.8 ± 2.2^a
ICM	19.8 ± 6.6^b
ACM	33.6 ± 10.4^c

CCM : DMEM/Ham's F12+10% calf serum.

ICM : CCM + conditioned medium from isthmic cells.

ACM : CCM + conditioned medium from ampullary cells.

Values are mean \pm SEM.

Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Primary cultured isthmic epithelial cells were dispersed into single cells by the trypsin and EDTA treatment, then seeded at a rate of 100 cells/35mm dish. After 5 days incubation in CCM, ICM, and ACM, colony formation rate was examined in each medium.

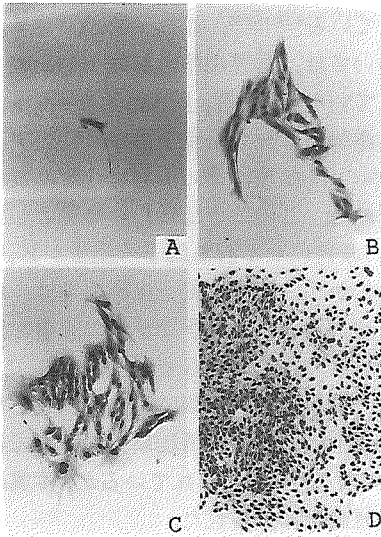


Fig. 4 Colony formation by isthmic cells on day 5 of subculture. A) A non-proliferated cell. B) C) and D) A cell proliferated to 42, 96, and more than 300 cells, respectively.

らなり、これらのコロニーはいずれも一細胞から増殖した細胞と考えられる。

考 察

血清中には細胞の増殖・分化にかかわる種々のホルモン、細胞成長因子や栄養素などが含まれているため、ホルモンや生理活性物質の作用機構を究明する場合には血清の存在はかえって不利な条件となり、無血清培養が望まれている。Orly と Sato¹²⁾は血清のもつ細胞増殖促進機能を詳細に検討し、血清の代替因子としてインスリン、トランスフェリン、ヒドロコルチゾンおよびフィブロネクチンを用いてブタ顆粒層細胞の無血清培養に成功した。彼らは顆粒層細胞におけるプロジェステロン産生能は無血清培養細胞では血清培養細胞の数倍から十数倍に達することを報告している¹³⁾。Tomooka ら¹⁷⁾は DMEM/Ham's F12にインスリン、トランスフェリン、ヒドロコルチゾン、ビタミンA (レチノール) および EGF を添加し、コラーゲンコート培養皿を用いてマウス子宮上皮細胞の無血清培養に成功している。その後、Hanazono ら⁴⁾もマウス子宮上皮細胞の無血清培養を

試み、彼らは Tomooka らの培地に BSA を添加している。培地に EGF や BSA を添加することは、本研究のように上皮細胞の生産する高分子物質の細胞増殖活性を検討する場合には問題となる。さらに、乳腺や卵管・子宮の無血清培養には培地中の Ca^{2+} 濃度を生理的濃度の $1/10 \sim 1/20$ の $0.1 \sim 0.05 \text{ mM}$ に下げて培養されている。培地中の Ca^{2+} 濃度を著しく低下させることは細胞の培養皿への接着や初期増殖には有利と考えられるが、コンフルエント後の細胞機能を阻害する可能性もある。本研究では培地に BSA および EGF を添加せず、さらに、 Ca^{2+} 濃度を 1.05 mM として培養した結果、卵管上皮細胞では少なくとも12日間以上の培養が可能であり、線毛運動は培養期間中認められた。

この培養法を用いてブタ子宮上皮細胞を培養すると上皮様形態は3～4週間以上保たれ、ラット下垂体前葉細胞もこの培地によって5週間以上の培養が可能であった (未発表)。

この実験において用いられた EDTA とコラーゲナーゼによる細胞の分離方法と無血清完全合成培地を用いた培養法は卵管・子宮上皮細胞のみならず、他の上皮細胞にも適用できるものと思われる。

培養細胞は継代を繰り返すと本来持っている機能に変化し、また、細菌などによる汚染の機会も増加する。さらに、特定の機能をもつ細胞または株化細胞を維持するために細胞の凍結保存は極めて有効な手段となる。上皮細胞など動物細胞の一部を凍結保存する場合、一般に、DMSO などの凍害保護剤とともに血清または BSA が加えられている。一方、培養細胞における細胞増殖因子—成長因子などの研究には凍結培地から血清や BSA を除くことが望まれる。大野¹⁴⁾は L・P 3 細胞の無血清凍結保存において、培地に10% DMSO と0.1% MC を加えて凍結し、融解後に良好な細胞生存率を得ている。本研究においても培地への MC と DMSO の添加によって高い細胞生存率が得られ、MC と DMSO を用いたこの凍結法は無血清培養細胞の保存・維持のために、有用な手段であると考えられる。

卵管および子宮粘膜細胞は生体内ではエストロジェンの影響を受け、特異的なタンパク質や高分子物質を生産・放出していることが明らかにされている^{8,15,16,18}。これまで、プラスチック培養皿上で培養した卵管および子宮の上皮細胞については、培養細胞の形態やタンパク質産生におよぼすエストロジェン添加の影響は立証されていない。最近、Julianら⁹はラットの子宮上皮細胞をメンブランフィルター上で培養し、 E_2 添加によって培養上清中に特定タンパクが産生されることを報告している。本研究では培地への E_2 添加によって卵管上皮培養細胞は長期間上皮様形態を保ち、培養期間の延長が認められた。このことは新しい知見として注目され、培養細胞における細胞増殖、または細胞機能の維持にかかわる因子の産生が E_2 によって刺激されることを示唆しているものと思われる。しかし、卵管培養上皮細胞では、培養上清の SDS-PAGE からはエストロジェン依存性タンパク質は検出できなかった。なお、産生タンパク質の詳細な解析には放射性同位元素による取り込み実験が必要と思われる。

卵管上皮細胞は膨大部と峡部で形態的な相違が知られ、膨大部上皮細胞では分泌細胞と線毛細胞からなり、峡部細胞では分泌細胞や多い。ウシ卵管上皮細胞の血清加培養において線毛運動は5日目から減衰し、9日目には殆ど認められないことが報告⁵されているが、本実験においては培養期間（2週間以上）を通して活発な線毛運動が認められた。

哺乳動物細胞は様々な細胞成長因子を産生し、生体の細胞増殖と機能維持に重要な役割を果たしている。卵管上皮細胞とくに卵管の部位による細胞増殖活性は現在のところ、明らかにされていない。本実験では卵管膨大部および峡部の培養上清高分子画分（10 KDa >）に細胞増殖活性が認められ、その活性は卵管峡部より卵管膨大部の方が著しく高いことが明らかにされた。また、検定細胞として用いた卵管峡部上皮細胞は35mm培養皿では 10^5 個以下では殆ど増殖しない。この実験では35mm培養皿100個播種したので、細胞は完全に単離された状態で存在し、培養によって形成されたコロニー（大きいコロニーでは数百個）は1個の細胞が増殖したもので、クローンと考えられる。

以上の研究結果から、卵管上皮細胞の無血清培養法はほぼ確立された。とくに、この無血清培養法はホルモンや生理活性物質の検定と作用機構の解明、有用物質の生産などにおいて有力な手段になりうるものと思われる。また、卵管膨大部および峡部上皮細胞から細胞増殖因子の産生されることが明らかにされたが、この物質についてはさらに詳細な解析が望まれる。

摘 要

本研究ではブタ卵管上皮細胞の無血清培養法を検討し、この培養法によってブタの卵管上皮細胞から産生されるタンパク質の解析と培養上清中の高分子画分の細胞増殖活性を探索した。

未成熟のブタの卵管を EDTA とコラーゲナーゼで処理して、上皮細胞を分離した。無血清培地には DMEM/Ham's F12 の1:1混合液にインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ヒドロコルチゾン、レチノール、硫酸ストレプトマイシン、およびペニシリンを添加したものをを用いた。卵管細胞は培養6日目には単層コンフルエントの状態に達し、この状態は2週間保持された。また、電子顕微鏡観察の結果、培養細胞には上皮細胞の特徴である微絨毛とスポットデスモゾームが認められ、上皮細胞と判定された。初代培養卵管上皮細胞の凍結保存を試み、10% DMSO を含む凍結用培地に0.1%メチルセルロースを添加すると融解後に高い生存率が得られた。

培養6日目から8日目まで 10^{-6} Mの E_2 を培地に添加すると培養期間は2週間から3週間へと延長された。しかし、培養上清を SDS-電気泳動によって解析した結果、エストロジェン

依存タンパクバンドは見いだせなかった。

ブタの卵管膨大部と峽部の上皮細胞を別々に培養した結果、E₂の添加によってそれぞれの細胞において培養期間の延長が認められた。さらに、膨大部と峽部細胞の培養上清の電気泳動の結果、タンパクバンドの相違がみられた。

卵管膨大部と峽部の上皮細胞から産生される10 KDa以上の高分子画分の細胞増殖活性をブタ卵管峽部培養細胞のコロニー形成によって調べた。それぞれの培養上清中の高分子画分を10%血清加培地に加えて検定培地とした。その結果、培養5日後に対照とした10%血清区のコロニー形成率は極めて低く(2%)、卵管峽部の産生物質を含む培地で19%、卵管膨大部画分を含む培地では33%であり膨大部の細胞増殖活性が最も高かった。

この研究から、卵管膨大部と峽部細胞から細胞増殖因子が生産・放出されること、ならびに両者の活性に違いのあることが明らかにされた。

謝 辞

この研究は平成元年度から3年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究「生物生産のための細胞選抜と細胞育種」を分担して行ったものである。

文 献

- 1) Buhi, W. C., J. L. Vallet, and F. W. Bazer : De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *J. Exp. Zool.* **252**, 79—88 (1989)
- 2) Buhi, W. C., I. M. Alvarez, V. Sudhipong, and M. M. Dones-Smith : Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biol. Reprod.* **43**, 929—938 (1990)
- 3) Buhi, W. C., F. W. Bazer, I. M. Alvarez, and M. A. Mirando : *In vitro* synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 β -estradiol-treated ovariectomized ewes. *Endocrinology* **128**, 3086—3095 (1991)
- 4) Hanazono, M., K. Ota, and J. Kitoh : Isolation and serum free-culturing of uterine epithelial cells from proestrous mice. *Jpn. Anim. Reprod.* **37**, 1—8 (1991)
- 5) Hishinuma, M., Y. Takahashi, and H. Kanagawa : Isolation and monolayer culture of bovine oviduct epithelial cells. *Jpn. J. Vet. Sci.* **51**, 1201—1208 (1989)
- 6) Inaba, T., W. G. Wiest, R. C. Strickler, and J. Mori : Augmentation of the response of mouse uterine epithelial cells to estradiol by uterine stroma. *Endocrinology* **123**, 1253—1258 (1988)
- 7) Inomata, T., H. Ninomiya, and T. Nakamura : A brief method for removal of the uterine epithelium for biochemical studies in the rat. *Bull. Azabu Univ. Vet. Med.* **6**, 81—82 (1985)
- 8) Julian, J., D. D. Carson, and S. R. Glasser : Polarized rat uterine epithelium *in vitro* : Constitutive expression of estrogen-induced proteins. *Endocrinology* **130**, 79—87 (1992)
- 9) Malayer, J. R., P. J. Hansen, and W. C. Buhi : Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J. Exp. Zool.* **248**, 345—353 (1988)
- 10) 野田洋一・成本勝彦・後藤康夫・夏山 知・野々垣多加史・井田憲司・岸 淳二・都倉 隆・森 崇英 : 卵管由来胚発育促進活性の解析. *日本不妊学会雑誌* **36**, 325—333 (1991)
- 11) Oakley, B. R., D. R. Kirsch, and N. R. Morris : A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**, 361—363 (1980)
- 12) Orly, J., and G. Sato : Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell* **17**, 295—305 (1979)
- 13) Orly, J., G. Sato, and G. F. Erickson : Serum suppresses the expression of hormonally induced functions in cultured granulosa cells. *Cell* **20**, 817—827 (1980)
- 14) 大野忠夫 : 無血清培養細胞のための凍結保存用培地. *細胞工学* **7**, 171—172 (1988)
- 15) Takeda, A., N. Takahashi, and S. Shimizu : Identification and characterization of an estrogen-inducible glycoprotein (uterine secretory protein-1) synthesized and secreted by rat uterine epithelial cells. *Endocrinology* **122**, 105—113 (1988)
- 16) Takeda, A., and S. Shimizu : Molecular effects of antiestrogens (tamoxifen and LY117018) on estrogen-dependent glycoprotein (USP1) synthesized and secreted by rat uterine epithelial cells. *Endocrinology* **123**, 258—263 (1988)
- 17) Tomooka, Y., R. P. DiAgustine, and J. A. McLachlan : Proliferation of mouse uterine epithelial

- cells *in vitro*. *Endocrinology* **118**, 1011—1018 (1986)
- 18) Verhage, H. G., and A. T. Fazleabas : The *in vitro* synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*Papio anubis*) oviduct. *Endocrinology* **123**, 552—558 (1988)