

ヒト卵管上皮細胞の分離培養系の確立とその機能的検討

東京医科大学産科婦人科学教室 (指導: 高山雅臣 主任教授)

興石 真 高田 淳子 井坂 恵一 高山 雅臣

【要旨】 卵管は配偶子や受精卵が通過する管腔というだけでなく、精子の受精能獲得や受精卵の発育に関して重要な役割をも担っていると考えられているが、その生理機能的詳細は十分には解明されていない。そこで、本研究では卵管の生理的動態を解明するために、ヒト卵管について (1) 卵管上皮細胞の純化、(2) 単層培養系の作成および細胞増殖因子添加による影響、(3) 細胞外基質を利用したより生理的に近い培養系の作成、(4) その培養系による培養細胞の形態変化、および (5) 分泌能について検討を行った。

その結果、(1) 卵管組織より、上皮細胞のみを単離純化し培養系を作成することができた。(2) その培養系においてエストラジオールによる細胞増殖効果が確認された。(3) 卵管上皮培養細胞より PGE_2 、 $\text{PGF}_2\alpha$ 、CA125 の分泌が確認された。(4) その PG 分泌能は培養系への細胞外基質の導入により、3 次元構造を構築したとき著明に促進し、組織培養の分泌動態に類似した。(5) この 3 次元構造を構築する卵管上皮細胞培養系は形態的、機能的に培養細胞が活性化されていると考えられ、卵管の機能研究に有用であると考えられた。

はじめに

近年、不妊治療において、体外受精胚移植が広く行われるようになってきたが、低い妊娠率、高い流産率など問題点が多く、技術的にはまだ改善の余地がある。これらの問題解決の一つのアプローチとして、受精および胚発生を補助し、妊娠率を向上させるために、体細胞と配偶子や受精卵との共培養が検討されている。

一方、生体内での卵管の役割は配偶子や受精卵が通過する管腔というだけでなく、精子の受精能獲得や受精卵の発育に関して重要な役割を担っていると考えられている。近年、卵の体外発生において卵管との共培養が役割率の向上に寄与するという報告が相次いでいる。その後、卵管以外の組織との共培養であっても良好な成績が報告され、卵管固有の効果というよりは、共培養という操作が、培養条件の改善につながる効果を有することが推察¹⁾されており、卵管由来のいかなる因子が卵の発育に望ましいのかは現段階では結論は出ていない。

そこで、本研究では卵管上皮細胞の生理的動態を

解明するために、①卵管上皮細胞の純化、②単層培養系の作成および細胞増殖因子添加による影響、③細胞外基質を利用したより生理的に近い培養系の作成、④その培養系による培養細胞の形態変化、および⑤分泌能について検討を行った。

卵管上皮細胞は月経周期に同期して周期的な形態変化をきたすことが報告されている^{2)~5)}。このことはホルモン刺激により、その増殖能や形態に変化をきたすことを示唆する。これを検証するために上皮細胞の培養系を用いてエストラジオール (以下 E_2) やプロゲステロン (以下 P) を含む細胞増殖因子を添加しその影響を検討した。

生理機能的詳細を解析するためには、単純な培養系だけでなく、よりインビボに近い機能を発現する培養系が必要であると考えられる。我々は基底膜成分を含むゲル上で生理的卵管の上皮組織構造に近い形態をとる卵管上皮細胞培養系を既に報告した⁶⁾。この系を利用して分泌能の検討を行った。培養細胞の分泌能の検討には、本来は細胞より特異的に産生分泌する物質あるいは蛋白をマーカーとして、細胞の状態を把握できれば良いのであるが、卵管上皮細

1996年3月2日受付, 1996年3月7日受理

キーワード: 卵管, 細胞培養, 細胞外基質, プロスタグランジン, CA125.

(印刷請求先: 〒161 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学産科婦人科学教室 興石 真)

胞における特異マーカーは知られていない。兎の実験で卵管液中の PGE_2 , $\text{PGF}_2\alpha$ の濃度は血清中の濃度と異なっていて、卵管上皮細胞から能動的に分泌される可能性があるとの報告があり⁷⁾、ヒトでも卵管組織内で6ケト- $\text{PGF}_1\alpha$, PGE_2 , $\text{PGF}_2\alpha$, PGD_2 が産生されていることが証明されている⁸⁾。また腫瘍マーカーである CA125 は正常子宮内膜培養細胞より産生することが知られているが、女性内性器では他に卵巣や卵管上皮における免疫組織学的局在も報告されている¹⁰⁾。これらのことから、今回 PGE_2 , $\text{PGF}_2\alpha$, CA125 がヒト卵管上皮細胞の培養上清中に分泌されているか否か確認するとともに、その分泌動態について検討を行った。

研究材料および方法

1. 卵管上皮細胞の採取法

卵管は子宮筋腫手術時の摘出卵管を患者の承諾を得て使用した。患者の年齢は36～49歳で、摘出時の月経周期は4名は卵胞期、4名は黄体期であった。

摘出卵管全体をカルシウム、マグネシウムを含有しないハンクス緩衝液で洗浄する。外膜を剥離して筋層まで露出し、周囲の疎な脂肪織や血管を除去して屈曲を解除する。長軸に沿って切り開き、上皮面を展開する。上皮面に肉眼的に見える皺壁を鑷子でつまみ上げハサミで切り取り、とれた細片をハンクス緩衝液に浮かべる。このときできるだけ表面のやわらかい組織を $0.5 \times 0.5 \times 5$ mm 程度の大きさになるように切り取る。

得られた細組織片をハンクス緩衝液中で振盪し洗浄する。これを $250 \mu\text{m}$ のステンレスメッシュに通し、メッシュ上に残った組織をハンクス緩衝液 30 ml で洗浄する。ステンレスメッシュを逆さまにして、ハンクス緩衝液を 30 ml 通して組織片を回収する。組織片をさらに $0.5 \times 0.5 \times 1$ mm 程度の大きさになるようにハサミでできるだけ細切する。

組織浮遊液を遠沈管に入れ10分間静置後、上清をピペットで除去する。沈殿した細片に0.05%トリプシン-EDTA 5 ml とハンクス緩衝液 5 ml を入れて混和し、三角フラスコに入れ、 37°C でスターラで強く攪拌しながら20分～40分インキュベートする。

反応液を子ウシ血清 5 ml と混和後、 $250 \mu\text{m}$ メッシュで濾過し、ハンクス緩衝液 50 ml で洗浄する。濾過液を回収し 1000 rpm, 10 分遠沈し、上清をピペットで除去する。沈渣を GIT 培地 (和光純薬製、血清

添加不要の完全調整培地) 4 ml で懸濁させ、回収卵管上皮細胞とした。

この回収卵管上皮細胞懸濁液を6穴マルチウエルプレート (Corning 社、米国) に撒いて、 37°C , 5% CO_2 の条件下にて培養を開始した。コンフルエントになるまで7日間前後培養する。

0.05% トリプシン-EDTA で細胞を剥離し Dulbecco's Modified Eagle's 培養液/Ham's F12 培養液、1:1 混合液 (以下 DMEM/F12 培地と記す) で2回洗浄を行ったのち、GIT 培地で細胞を懸濁させたものを純化卵管上皮細胞とした。この一部をトリパンブルーで染色し生細胞を Neubauer 型血球計算盤を用い、位相差顕微鏡下でカウントした。細胞数を培養容器の底面積で除算し飽和細胞密度 (confluent cell density, 以下 CCD と記す) を算出した。純化卵管上皮細胞をチャンバー・スライド上で培養し、酵素抗体法間接法により抗サイトケラチン、抗ビメンチン、抗 α_1 アンチキモトリプシン (α_1 ACT), 抗 c-erbB-2¹⁰⁾ の免疫染色を行い、上皮細胞を同定した。

2. 培地の妥当性の検討

①血清無添加 DMEM/F12 培地, ②1% ウシ胎児血清 (fetal calf serum, 以下 FCS と記す) 添加 DMEM/F12 培地, ③10% FCS 添加 DMEM/F12 培地, ④GIT 培地の4種類の培養液に純化卵管培養細胞を 2×10^5 cell/ml になるように懸濁し、24穴マルチウエルプレートに1wellあたりそれぞれ0.5 ml となるように分注する (CCD の0.83倍の細胞密度となる。以下これを $0.83 \times \text{CCD}$ と表記する。)。毎日観察を行い、4日毎に培地を交換する。増殖の程度を位相差顕微鏡下で判定し、また培養開始より培養細胞の剥離がみられるまでの日数を比較した。

3. 細胞増殖因子添加による増殖能の変化

純化卵管上皮細胞懸濁液を 6×10^4 cell/ml となるように調整し、96穴マルチウエルプレートに1穴につき0.1 ml となるように分注する ($0.31 \times \text{CCD}$ となる)。2日間培養した後、 E_2 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M), P (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M), 上皮増殖因子 (epidermal growth factor, 以下 EGF) (0.1, 1, 10, 100 ng/ml), (血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor, 以下 PDGF) (0.1, 1, 10, 100 ng/ml) を添加しさらに培養を続ける。

4日間培養を行った後、トリプシンで細胞を剥離し、トリパンブルーで染色し生細胞のカウントを行

い、同時に培養した無添加群と比較した。

統計学的処理は Student's T test で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 細胞外基質による培養細胞の増殖形態の検討

細胞外基質として①I型コラーゲン(ラット), ②IV型コラーゲン(マウス), ③フィブロネクチン(ヒト), ④ラミニン(マウス), ⑤EHS薄層コート, ⑥EHSゲルについて検討した。①~④はコーティング済みのものを使用した (Bio Coat™: Becton Dickinson Labware 社, 米国)。EHSとはマウスの軟骨肉腫 (Engelbreth-Holm-Swarm 腫瘍) であり, この腫瘍より抽出した基底膜成分を細胞外基質として利用する。主成分としてIV型コラーゲン, ラミニン, 微量成分としてプロテオグリカン, エンタクチン等を含有している。4°Cでは液状で, 室温でゲル化する。⑤はこの基底膜成分をコートしたマルチウエルプレートで, EHS Natrix™ (Becton Dickinson Labware 社, 米国) を使用した。⑥はEHSの基底膜成分のゲルであり Basement membrane Matrigel™ (以下マトリゲルと記す; Becton Dickinson Labware 社, 米国) を使用した。6穴マルチウエルプレート (well 径 ϕ 35 mm) に1穴につき1.8 ml 注入して約2 mm厚のゲル層の培養基質を作成し使用した。

純化卵管上皮細胞懸濁液を 6×10^4 cell/ml となるように調整し, 上記の基底膜成分がコートしてある6穴マルチウエルプレートに1穴につき1 ml となるように分注する ($0.1 \times \text{CCD}$ となる)。

位相差顕微鏡下で形態変化を連日観察した。

⑥は培養8日目でゲルごと切りだして固定し, 走査型電子顕微鏡にて撮影した。また同時に別の well から超薄切片を作成し, 透過型電子顕微鏡にて撮影を行った。

5. 培養細胞の分泌能の検討

マトリゲル系 (以下 M 系) は, 24穴マルチウエルプレート (well 径 ϕ 16 mm) にマトリゲルを1穴につき0.4 ml 注入してゲルの厚さが2 mmの培養基質を作成した。純化卵管上皮細胞懸濁液を 2×10^5 cell/ml となるよう調製し, 1穴につき0.5 ml となるように分注し ($0.83 \times \text{CCD}$ となる) 培養を開始した。対照系 (以下 C 系) は EHS 薄層コート済の24穴マルチウエルプレートを使用し, M系と同量の細胞液を分注し培養を開始した。培養開始後は2日目より5日目まで連日全量の培地を交換した。交換し

た培地は3000 rpm で遠沈し, 上清を測定まで -20°C で凍結保存した。ELISA法により CA125, PGE₂, PGF₂ α の測定は, それぞれイムノクロン CA125 (富士レビオ), PGE₂ ELISA kit (Cayman Chemical 社, 米国), PGF₂ α ELISA kit (Cayman Chemical 社, 米国) を用いて行った。また, 5日目に Dispase (Becton Dickinson Labware 社, 米国) を使用して, マトリゲルより培養細胞を単離し回収した。この一部をトリパンブルーで染色し生細胞をカウントして各 well 毎の細胞数を確認し, 培養細胞 10^4 個あたりの分泌量の補正值を算出した。

組織培養についても同時に検討を行った。上皮細胞の採取時と同様に周囲組織を除去し, 切り開いた卵管を, 2×2 mm の大きさに切り出して, EHS 薄層コート済の24穴マルチウエルプレートに数個ずつのせて培養を開始した。培養2日目より5日目まで連日全量の培地を交換した。交換した培地は3000 rpm で遠沈し, 上清を測定まで -20°C で凍結保存した。ELISA法により PGE₂, PGF₂ α の測定を行った。

統計学的処理は Student's T test で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

1. 卵管上皮細胞の採取

回収卵管上皮細胞を位相差顕微鏡で観察すると, 大部分は単独細胞だが, 数個程度の塊状の細胞も多数みられた (Fig. 1 a)。活発に運動する線毛を持つ細胞が散見された。これらの細胞は線毛運動の反動により一見泳動しているように見えた。

回収卵管上皮細胞は GIT 培地でバラの花弁状ないし類円形にコロニーを形成しながら増殖しはじめ, 培養開始7日前後でコンフルエントに達した。この時点では線毛運動の見られる細胞は観察されなかった。また形態的に間質細胞などの混入はほとんど認めなかった (Fig. 2)。

純化卵管上皮細胞の免疫染色では, 抗サイトケラチン, 抗 c-erbB-2 で染色され, 抗ピメンチン, 抗 α_1 ATC には染色されなかった。このことから採取された細胞は上皮細胞であることが確認された。

純化卵管上皮細胞の CCD は平均 $6.1 \times 10^8 \pm 4.2 \times 10^7$ cell/m² であった。以後の検討では CCD を 6×10^8 cell/m² として扱い計算した。1本の卵管から純化卵管上皮細胞として得られる細胞数は, 平

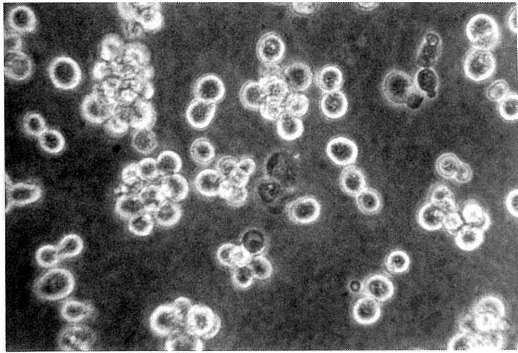


Fig. 1a 回収卵管上皮細胞（組織細切法）
回収卵管上皮細胞を位相差顕微鏡像。大部分は単独細胞だが、数個程度の塊状の細胞も多数みられた（×200）。

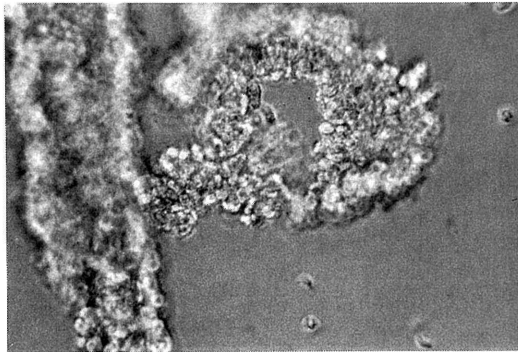


Fig. 1b 回収卵管上皮細胞（メッシュ法）
メッシュにより篩別した後回収した細胞。かなり多数の細胞により構成される細胞塊となっている。ほとんどが上皮細胞により構成されると推察される（×200）。

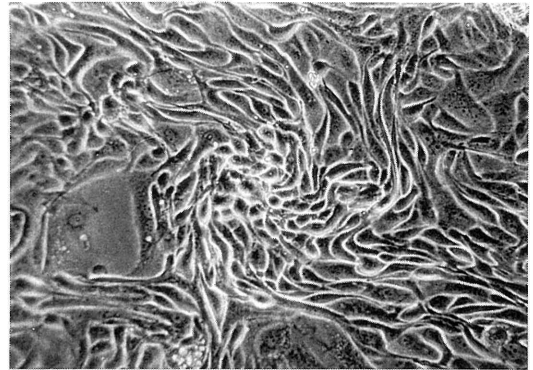


Fig. 2 純化卵管上皮培養細胞
回収卵管上皮細胞をGIT培地で培養した。7日前後でコンフルエントに達した。形態的に間質細胞などの混入はほとんど認めなかった。線毛運動の見られる細胞は観察されなかった（×100）。

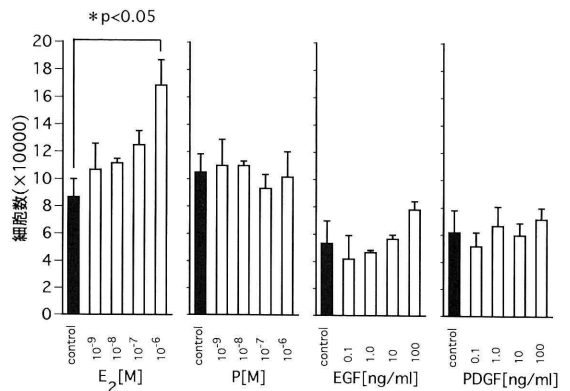


Fig. 3 細胞増殖因子添加による増殖能の変化
E₂ 添加では 10⁻⁶ M で無添加群にくらべて有意に細胞増殖が認められた。P, EGF, PDGF では増殖効果は認められなかった。

均 6.6×10⁵ 個/1 卵管であった。

2. 培地の妥当性の検討

血清無添加 DMEM/F12 培地では培養 2 日目に数個程度のコロニーが散見されたが、それ以上の増殖はみられなかった。1% FCS 添加 DMEM/F12 培地では増殖傾向がみられたが、コンフルエントには至らず、培養 7 日目には一部の細胞の剥離が認められた。10% FCS 添加 DMEM/F12 培地では、7 日目までにコンフルエントに達し、30 日目までに培養細胞の剥離はみられなかったが、形態的には線維芽細胞と考えられる紡錘形の細胞集団が多数認められた。GIT 培地では、7 日目までにコンフルエントに達し、30 日目までに培養細胞の剥離はみられなかった。形態的にはほぼ均一で紡錘形の細胞はほとんど

認められなかった。

3. 細胞増殖因子添加による増殖能の変化

実験を行った濃度域においては E₂ 添加では 10⁻⁶ M で無添加群にくらべて有意に細胞増殖が認められた。P, EGF, PDGF の添加では増殖は認められなかった (Fig. 3)。

E₂, P, EGF, PDGF いずれの添加によっても光学顕微鏡レベルでの形態変化は確認できなかった。

4. 細胞外基質による培養細胞の増殖形態の検討

①～⑤各種細胞外基質をコートした培養皿では、培養細胞は水平方向に単層で増殖し、細胞形態は細胞外基質を使用しない場合と異なる差異は認められなかった。⑥の 2 mm 厚のマトリゲルを培養基質と

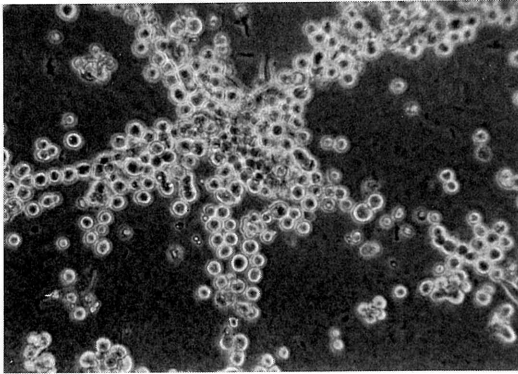


Fig. 4 マトリゲル上の培養細胞 (培養開始後4時間)
2 mm厚のマトリゲルを培養基質として使用して培養を開始した。上皮細胞は培養開始後4時間でゲル表面上で写真のような集合を見せた(×100)。

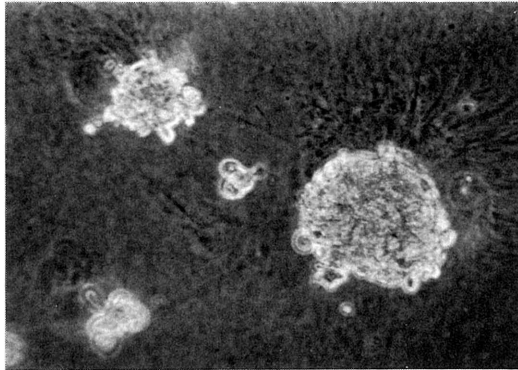


Fig. 5 マトリゲル上の培養細胞 (培養開始後24時間)

24時間後には垂直方向への形態変化を示し、円筒状の立体構造を形成した。この構造物の周囲のゲルは構造物を中心として光芒状の所見がみられ、ゲル自体にも変化を来していることが推測された(×100)。

して使用した場合には、上皮細胞はゲル表面上で培養開始後4時間で集合し(Fig. 4)、24時間後には垂直方向への形態変化を示し、円筒状の構造を形成した(Fig. 5)。成分が同じEHS由来基底膜成分であっても、⑤の薄層コートと⑥のゲルで形態的に違いが生じた。

マトリゲル上で形成された円筒状構造の構成細胞は電顕的に、自由表面に微絨毛がみとめられ上皮細胞であることが確認された。またごく少数ではあるが、短い線毛状の構造をもつ細胞が認められた(Fig. 6)。

この円筒状構造物を水平断にしてみると内部は管

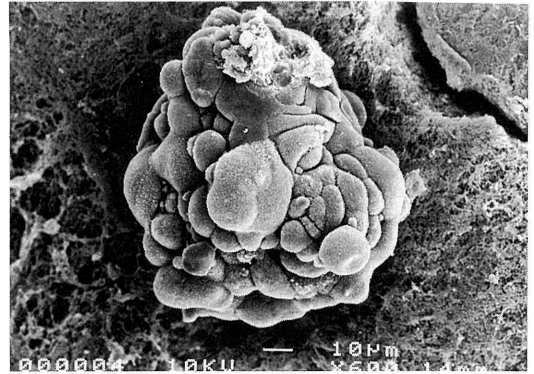


Fig. 6 立体構造の走査電子顕微鏡像

マトリゲル上で形成された円筒状構造の構成細胞は自由表面に微絨毛が認められ上皮細胞であることが確認された。またごく少数ではあるが、短い線毛状の構造をもつ細胞が認められた(×900)。

腔状の中空ではなく、細胞が重層しているのでもなく、マトリゲルが充満したものであった。個々の細胞をみてみると、ある一面は微絨毛のある自由表面で培養液に接し、他の面はマトリゲルへ接していた。この細胞とマトリゲルとの接着面には、電顕的に基底膜様の所見が認められた(Fig. 7)。

5. 培養細胞の分泌能の検討

C系およびM系いずれの培養上清中にも、CA125、PGE₂、PGF₂αの分泌が確認された。

5日間培養後のDispaseによる細胞回収では、C系は1穴あたり35×10⁴ cell、M系では1穴あたり6×10⁴ cellであった。C系の細胞密度は1.7×10⁹ cell/m²であり、細胞外基質を用いない培養皿上での培養による細胞密度よりも約3倍高い値を示した。

24時間あたりの平均分泌量で比較すると、培養細胞10⁴個あたりのCA125の分泌量はM系、C系において有意な差は認められなかった。

PGE₂およびPGF₂αでは培養細胞10⁴個あたりの分泌量はC系に比べてM系で有意に多く、著明な差が認められた(Fig. 8)。

PGE₂とPGF₂αの比率をみた場合、いずれの培養系においても、PGE₂が優位であった。またPGE₂/PGF₂α比は、C系では16.2、M系では7.9、組織培養系では5.7であり、M系と組織培養系では比率に有意差は無かったが、C系とM系およびC系と組織培養系では有意差を認めた(Fig. 9)。

織培養系では有意差を認めた (Fig. 9).

考 察

文献的に報告されている卵管上皮細胞の採取法と

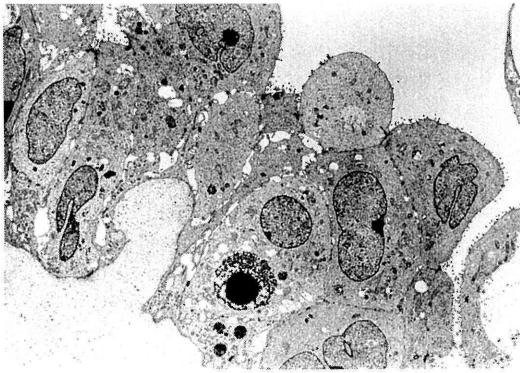


Fig. 7 立体構造の透過電子顕微鏡像
 マトリゲル上で形成された円筒状構造物を水平断してみると内部はマトリゲルが充満したものであった。個々の細胞をみてみると、一方は微絨毛のある自由表面で培養液に接し、他方はマトリゲルへ接していた。この細胞とマトリゲルとの接着面には、基底膜様所見が認められた (×3600)

しては、大きく分けて、(1) 管腔のままで内腔に酵素液等を灌流して上皮細胞流し出す方法¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ (灌流法)、(2) 細切した組織を酵素液で分解した後、メッシュで上皮細胞と間質細胞を分別する方法⁶⁾¹⁶⁾ (メッシュ法)、(3) 卵管組織から機械的な方法で上皮細胞層を回収する方法¹⁷⁾ (上皮細切法) の3種類に分類できる。(括弧内に記した各法の名称は、説明の便宜上、本稿において筆者が命名した)

灌流法は卵管や血管のような管腔表面の細胞を回収するためには論理的であるが、実際に行ってみると卵管においては手技的に難しい。漿膜下で屈曲しているため漿膜を剥離しないと十分に灌流できない。漿膜を剥離しておく、灌流は容易だが酵素処理中に穴があいてしまうことが多い、等の欠点がある。

我々は当初、卵管上皮は子宮内膜の延長であるとの考えから、卵管上皮細胞の採取方法として子宮内膜上皮細胞の採取法である Satyaswaroop らの方法¹⁸⁾ を準用して採取を行った⁶⁾。メッシュ法の基本的な考え方はこれに基づいていると考えられる。メッシュにより篩別した後回収した細胞を見てみると、かなり多数の細胞により構成される細胞塊とな

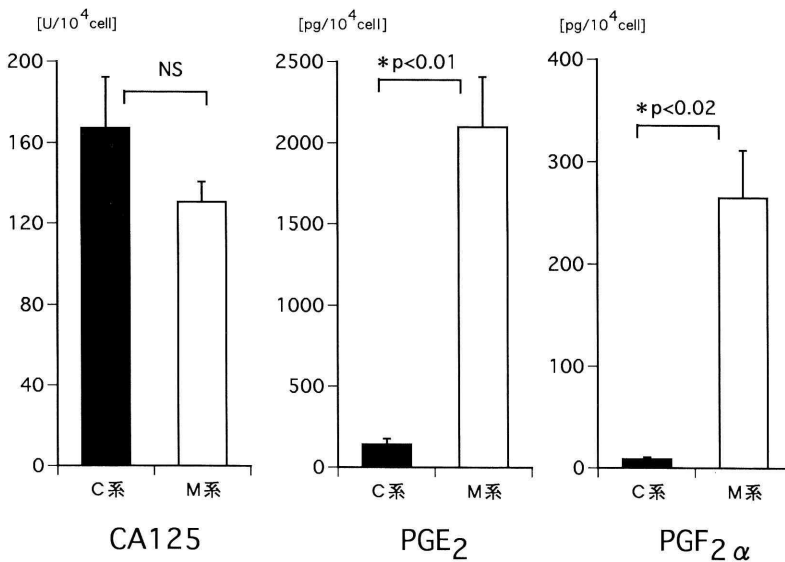


Fig. 8 CA125, PGE₂, PGF₂α の分泌能
 C系およびM系いずれの培養上清中にも、CA125, PGE₂, PGF₂α の分泌が確認された。棒グラフは24時間あたりの平均分泌量で示した。培養細胞10⁴個あたりのCA125の分泌量はM系、C系において有意な差は認められなかった。一方、PGE₂およびPGF₂αでは培養細胞10⁴個あたりの分泌量はC系に比べてM系で有意に多く、著明な差が認められた。

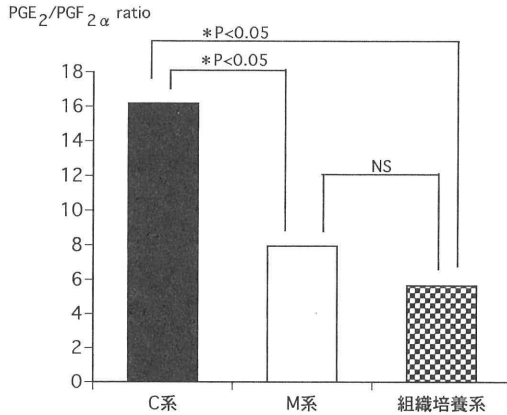


Fig. 9 PGE₂ と PGF₂α の比率

いずれの培養系においても, PGE₂ が優位であった。PGE₂/PGF₂α 比は, C系では 16.2, M系では 7.9, 組織培養系では 5.7 であり, M系と組織培養系では比率に有意差は無かったが, C系と M系および C系と組織培養系では有意差を認めた。

っている (Fig. 1 b)。これはほとんどが上皮細胞により構成されていると推察され, 大きな細胞塊となっているためにメッシュによって篩別することができると考えられる。しかし大きな細胞塊であるため無血清培地による選択培養時に, 十分に培養皿表面に接着できず, 結果として回収細胞数にばらつきが多くなり, 一般に少量しか回収できなかった。組織学的に再考してみると, 卵管では子宮内膜にくらべて間質の細胞成分はごく少ない。また上皮細胞の性周期による形態変化は, 子宮内膜細胞に比べて少なく, 卵管上皮細胞の採取法としてはメッシュ法はあまり論理的とはいえないと考えられる。

一方, 卵管を漿膜を剥離してまっすぐにした後展開すると, 肉眼的にも皺壁がみられるが, これをハサミで細切するだけで, その構成細胞の大部分が上皮細胞である組織細片が採取できる。これを酵素処理することにより単独細胞化し, 回収する方法がもっとも多量かつ安定に上皮細胞を採取することができる (組織細切法)。もちろん若干の間質細胞の混入は認められるが, 無血清培地で培養することにより間質細胞の増殖が抑制され¹⁰⁾, 十分に上皮細胞を純化できると考えられる。

卵管からの回収細胞数について言及されている報告は少ないが, 夏山らは¹⁵⁾ プタの卵管から灌流法を用いて, 卵管 1本あたり 1.58×10^5 個の上皮細胞が安定して回収できたと報告している。種が違うので

一概に比較はできないが, 我々は卵管 1本あたり 6.64×10^5 個と若干良好である。しかし, 回収細胞を培養する段階で十分接着せずにロスが出ているので, この段階で, コラーゲン処理をした培養器を使うなど改良すればより多くの卵管上皮細胞を収穫できる可能性がある。

以上より卵管上皮細胞採取法としてもっともすぐれているのは組織細切法と考えられた。

卵管上皮細胞は形態学的に線毛細胞, 分泌細胞, 小桿細胞, 基底明澄細胞の 4つに分けられているが, 線毛細胞と分泌細胞が大部分を占めている。藤井³⁾ は線毛細胞の占める割合は峽部で 30%, 膨大部で 50%, 采部で 60% で, 性周期や閉経により著変は無いと報告している。今回の実験では明らかに線毛細胞とわかる細胞は, 回収細胞の段階で散見される程度であり, さらに培養後の純化細胞の段階ではほとんど皆無になっている。

この理由として, まず機械的操作および酵素処理時に線毛が破損することが考えられる。酵素処理を短時間にすると, 塊状の細胞は多くなるものの, 線毛運動がみられる細胞は増えるということが観察されている (自験例)。次に回収細胞を培養する段階で線毛運動が培養皿底面への接着を阻害するのではないかと考えられる。

このため, 今回の純化卵管上皮細胞は大部分が分泌細胞, あるいは一部, 線毛の脱落后した線毛細胞が混在している細胞集団であると推測される。

また, 生体内では線毛細胞は分泌細胞から移行するとの説や, 脱落后した線毛が再生するとの説があるが, 長期間培養しても線毛運動をする細胞が増えてくることは確認されず, これらの説は考えにくいように思われるが, 培養系のホルモン環境の条件を変えて再度検討してみる必要はある。

卵管上皮細胞は, 子宮内膜上皮細胞の培養¹⁹⁾と同様に GIT 培地を使用することで, より純粋で良好な発育が得られた。

一般に間質細胞の増殖には FCS の存在が必要であるとされているが, 血清添加不要の完全調整培地 (GIT 培地) を用いることにより, 間質細胞の発育が抑制された。また卵管上皮細胞は良好な発育がみられた。なお加納ら¹⁶⁾ は線維芽細胞の抑制には無血清とカルシウムイオンの除去が必要であることを指摘している。

GIT 培地を用いた培養系は, 上皮細胞の選別に有

効であり、かつ純粋な状態での培養維持ができ、また血清中に含まれる未知の因子による影響を考えずに済むという点から、卵管上皮細胞の培養において有用性が高いと考えられる。

単層培養系への細胞増殖因子の添加実験では E_2 10^{-6} M 添加により卵管上皮細胞の増殖効果があることが確認された。

藤井³⁾は電顕による形態学的な検討により、閉経後の分泌細胞の萎縮性変化にはエストロゲンが関与している可能性を指摘している。また岡本⁵⁾は去勢家兎を用いた性ステロイド負荷実験で、 E_2 投与により線毛・分泌両細胞に再生増殖を認めたことを報告している。一方、培養細胞による実験では、加納¹⁶⁾は E_2 、P の添加では細胞増殖効果はみられなかったとしている。また竹内²⁰⁾は EGF で細胞増殖効果がみられたものの E_2 、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、トランスフェリン、インスリン様増殖因子 (IGF) では促進されず、P では増殖は逆に抑制されたとしている。

我々の実験では、加納らの報告している E_2 濃度より若干高濃度域ではじめて細胞増殖効果が得られることを確認した。この結果によりインビポにおける E_2 の卵管上皮細胞に対する再生増殖作用が、培養細胞レベルにおいて実証されたものと考えられた。

細胞外基質としてマトリゲルを使用した場合、血管内皮細胞では管状構造、子宮内膜では腺管構造²¹⁾を示すと報告されている。卵管上皮培養細胞でも類似の形態を示したが、この垂直構造は細胞のみの重層により管腔として形成されたものではない。

EHS 薄層コートのマルチウエルプレートではマトリゲルと含有成分は同じにもかかわらず垂直変化を惹起できない。このことから培養基質の含有成分だけでなく培養基質の物理的要素である可塑性の関与が考えられる。すなわち細胞の接着による形態変化または増殖により可塑性のあるゲル表面が吸い上げられるように突出して形成されると考えられた⁶⁾。

この形態をインビポの上皮細胞と比較して考えてみる。卵管上皮組織は基底膜の上に単層の組織を形成し、間質組織の凹凸により全体として凹凸の皺壁を形成している。個々の上皮細胞は円柱状の形態をとっており、藤井は³⁾走査電顕による研究で、分泌細胞が卵管内腔表面に占める大きさは、性周期により

異なるものの、最少で $3.6 \times 3.1 \mu\text{m}$ (長径 \times 短径)、最大でも $15.8 \times 6.8 \mu\text{m}$ としている。

一方、培養細胞では単層培養系では細胞は水平方向に引き伸ばされたような不自然な形となる。今回測定された卵管上皮培養細胞の単層培養系における CCD より、個々の細胞面積を算出すると、 $1.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{cell}$ となる。卵管組織中において分泌細胞が卵管内腔表面に占める面積を藤井による報告の値を利用して試算すると、最少で $3.6 \times 3.1 \mu\text{m}$ の菱形として $5.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{cell}$ 、最大で $15.8 \times 6.8 \mu\text{m}$ の長方形として $1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{cell}$ となる。これらインビポの場合の推定細胞面積と単層培養系における細胞面積を比較すると、単層培養系ではインビポと比較して、約 15 倍から 300 倍の面積になっている。細胞容積が一定だとすれば、逆に厚さは約 1/15 倍から 1/300 にうすく引き伸ばされた変形した形態になっていることになる。

一方、マトリゲル系ではマトリゲルという基底膜成分含有の基質の上に個々の細胞は球系ないしは円柱状で、単層で増殖し、全体として立体構造を形成して実際の卵管上皮組織に類似した形態になっていると考えられる。この形態形成モデル⁶⁾によれば個々の細胞は、細胞同士で重層せず、基底膜成分含有のゲル表面上に単層で付着し増殖する形態になるので、垂直形態をとりながら安定した細胞の生育が維持できるものと考えられた。

石井²²⁾は、コラーゲン・ゲルを使用した子宮内膜インビトロ・モデルにおいて、基底膜の形成のみで細胞の機能分化が誘導されるとは言えないであろうが、基底膜の形成の有無、あるいは基底膜の形成を促す培養条件が上皮細胞のホルモン反応性に関与していると考えられることもできると指摘して、生理機能発現への形態の関与の可能性を示唆している。

今回、卵管上皮培養細胞から培養上清中への PGE_2 、 $\text{PGF}_2\alpha$ 、CA125 の分泌が証明されたが、CA125 の分泌動態は、培養形態により有意差を認めず、卵管上皮細胞の増殖マーカーとして使用し得る可能性が示唆された。

一方、 PGE_2 、 $\text{PGF}_2\alpha$ はマトリゲル上で 3 次元構造を構築する卵管上皮細胞培養系 (M 系) において著明な分泌亢進を認めた。このことから、M 系では形態的にインビポの卵管上皮組織に類似しているだけでなく、生理機能も活性化されていることが示唆された。

用し、受精卵の運搬・停滞に影響をおよぼす²³⁾と言われているが、種差もあり、ヒトでも卵管に存在する PGE₂ レセプター、PGF₂α レセプターの動態²⁴⁾などもあわせて考えると卵管における PGE₂、PGF₂α の作用は単純なものではないと考えられる。

蛭原ら⁷⁾による家兎の卵管液の生化学的性状の検討によると、hCG の投与により、卵管液中の PGE₂、PGF₂α は著明に増加を示すが、一方で血清中の PGE₂ は有意な増加、PGF₂α は微増を示すにとどまった。血清中と卵管液中の PGE₂、PGF₂α 分泌動態の解離は、卵管液成分が血液からの漏出によるものだけではなく、卵管上皮からの能動的分泌によるものであることを示すと指摘している。また卵管液中では PGF₂α が常に優位であり、とくに排卵後に PGF₂α 優位傾向が強くなるが、これは受精および受精後発育のために卵の停留に寄与していると蛭原らは推察している。

これらの点から PGE₂、PGF₂α が卵管内における生殖生理現象に強く関与しているものと考えられる。そして PGE₂、PGF₂α それぞれの分泌量だけでなく、PGE₂/PGF₂α 比も生理的に重要な意味を持っている可能性がある。M 系では、PGE₂、PGF₂α の分泌が亢進するだけでなく、PGE₂/PGF₂α 比は組織培養による値と近い値になっており、単層培養系よりも生理的に近い条件になっているものと考えられた。

以上より、マトリゲル上で3次元構造を構築する卵管上皮細胞培養系は、形態的に実際の卵管上皮組織に類似した形態になっていると考えられ、分泌能も亢進し、生理的に近い環境状態を形成していることが示唆された。このことからこの培養系は、卵管上皮組織のインビトロモデルとして、卵管機能研究に有用であると考えられた。

結 論

1. 卵管上皮細胞は組織細切法を用いて回収し、GIT 培地での培養により間質細胞を抑制して、上皮細胞のみを単離純化することが可能であった。
2. 卵管上皮培養細胞において E₂ による細胞増殖効果が確認された。
3. 卵管上皮培養細胞より PGE₂、PGF₂α、CA125 の分泌が確認された。
4. PG の分泌能は培養系への細胞外基質の導入により、3次元構造を構築したとき、著明に促進し組

織培養における分泌能に類似した。

5. この3次元構造を構築する卵管上皮細胞培養系は形態的、機能的に培養細胞が活性化されていると考えられ、卵管の機能研究に有用であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S: The search for improved *in-vitro* systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them Hum. Reprod. 8(8): 1155~1162, 1993
- 2) 橋本 透: ヒト卵管上皮の加齢、性周期における変化—走査型電子顕微鏡所見を中心として— 日不妊誌, 30(4): 443~450, 1985
- 3) 藤井恒夫: 成熟ヒト卵管上皮の性周期変化に関する形態学的研究 2. 走査型電子顕微鏡による表面超微構造の検討 広大医誌, 35(6): 1403~1415, 1987
- 4) 榎木 勇, 田中正明, 寺西二郎, 森本義晴, 渋谷嘉之, 福永正平, 河田泰彦: 卵管上皮の超微形態 臨産婦, 38(2): 91~96, 1984
- 5) 岡本吉夫: 卵管粘膜上皮—とくに線毛細胞についての形態的、機能的研究 日不妊誌, 33(4): 739~745, 1988
- 6) 興石 真, 井坂恵一, 高山雅臣: Matrigel を用いたヒト卵管上皮細胞の新しい培養モデルの検討 日産婦誌, 45(12): 1407~1408, 1993
- 7) 蛭原照男, 吉村泰典, 白木 誠, 丸山邦之, 市川文隆, 河上征治, 福島 穰, 小田高久: 卵管内環境因子に及ぼす卵管上皮の役割 日産婦誌, 41(7): 881~887, 1989
- 8) 三橋直樹, 吉田孝二, 沢登 環, 小池憲章, 安水洗彦, 加藤順三: 卵管におけるアラキドン酸代謝物の産生について 日不妊誌, 31(3): 421~424, 1986
- 9) Bishof P, Tseng L, Brioshi PA, Herrmann WL: Cancer antigen CA125 is produced by human endometrial stromal cells Hum. Reprod. 1: 423, 1986
- 10) 井田若葉, 小林 浩, 内藤泰久: 子宮内膜培養細胞における CA125 産生動態に関する研究 —正所内膜と異所内膜の比較— 日産婦誌, 42: 1161~1167, 1990
- 11) Zeimet AG, Holzner EM, Marth C, Daxenbichler G, Dapunt O: Tumor marker CA-125 in tissues of the female reproductive tract and in serum during the normal menstrual cycle Fertil. Steril. 59(5): 1028~35, 1993
- 12) Wang DP, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Iwai T, Nonogaki H, Mori T: Expression of c-erbB-2 protein and epidermal growth factor receptor in normal tissues of the female genital tract and in

- normal tissues of the female genital tract and in the placenta Virchows Arch a Pathol. Anat. Histopathol **420**(5) : 385~393, 1992
- 13) 菅野良恵, 星 和彦, 片寄治男, 鈴木留美, 佐藤 章 : 凍結保存ヒト卵管上皮細胞を用いた初期胚の共培養 日不妊誌, **40**(2) : 163~169, 1995
- 14) Bongso A, Chye NS, Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam SS : Establishment of human ampullary cell cultures Hum. Reprod., **4**(5) : 486~494, 1989
- 15) 夏山 知, 野田洋一, 成本勝彦, 都倉 隆, 森 崇英 : ブタ卵管上皮初代培養系の確立と超微形態的観察 日受精着床会誌, **7** : 172~176, 1990
- 16) 加納徳照 : ヒト卵管上皮細胞の無血清培養法の確立とその免疫組織学および超微形態学的研究 産婦の進歩, **47**(2) : 261~276, 1995
- 17) Henriksen T, Tanbo T, Abyholm T, Oppedal BR, Claussen OP, Hovig T : Epithelial cells from human Fallopian tube in culture Hum. Reprod., **5**(1) : 25~31, 1990
- 18) Satyaswaroop PG, Bressler RS, De La Pena MM, Gurpide E : Isolation and culture of human endometrial glands. J Clin. Endocrinol. Metab. **48** : 639~641, 1979
- 19) 井坂恵一, 興石 真, 舟山 仁, 高田淳子, 山辺志都子, 高山雅臣 : 環境因子からみたヒト正常子宮内膜上皮細胞の発育 産婦の世界 **45**(7) : 23~31, 1993
- 20) 竹内一浩, 山元慎一, 沖 利通, 森 明人, 福元清吾, 堂地 勉, 永田行博 : ヒト卵管上皮細胞の単層培養の確立 臨床と研究 **66**(12) : 3899~3900, 1989
- 21) 根上 晃 : 正常ヒト子宮内膜上皮細胞の *in vitro* における腺管形成ならび上皮化過程の形態学的研究 日産婦誌, **41**(12) : 1983~1990, 1989
- 22) 石井 新 : コラーゲン・ゲルを使用した, 腺上皮細胞と間質細胞の無血清培養による, ヒト子宮内膜 *in vitro* モデル再構築の試み 日産婦誌, **41**(4) : 434~449, 1989
- 23) 鈴木秋悦, 北井啓勝 : 生殖における卵管の役割 臨婦産, **38**(2) : 87~90, 1984
- 24) 田 根培, 高橋 徹, 佐藤信義, 中川真一, 鈴木英夫, 坂本秀樹, 高木繁夫 : レセプター・レベルよりみた着床およびその周辺期一性ステロイドとプロスタグランディンについて— 産婦の世界, **38**(3) : 269~276, 1986

Establishment of an Epithelial Cell Culture of Human Fallopian Tube and Functional Studies Thereon

Makoto KOSHIISHI, Junko TAKADA, Keiichi ISAKA and Masaomi TAKAYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College

Fallopian tubes are not only the lumens through which gametes and fertilized ova pass, they are thought to play an important part in the capacitation of sperm and the growth of fertilized ova. However, details of physiological and functional aspects have not been fully clarified. Thus, the following studies to clarify the physiological movement of epithelial cells of the fallopian tubes were performed. Epithelial cells of the human fallopian tube were purified and a monolayer culture system was established. A change in the proliferation potency was seen after the addition of the cell growth factor. A culture system satisfying physiological conditions was made using an extracellular matrix. The culture cells were examined and their ability to secrete was measured.

Only epithelial cells were purified from the fallopian tube tissue, and the culture system was successfully established. The cell multiplication effect of estradiol was confirmed in the cultivated epithelial cells. Secretion of PGE₂, PGF₂α, CA125 by cultured cells was confirmed, and that of PGE₂ and PGF₂α increased when a three-dimensional structure was made by the introduction of the extracellular matrix to the culture system. The cultured cell system formed a three-dimensional structure consisting of the epithelial cell of the fallopian tube and this was activated morphologically and functionally. This culture system was considered useful for functional research on the fallopian tube.

<Key words> Fallopian tube, Cell culture, Extracellular matrix, Prostaglandins, CA125.