

組織培養におけるヒト絨毛膜由来細胞に関する内分泌学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 久保, 忠 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9003

組織培養におけるヒト絨毛膜由来細胞に 関する内分泌学的研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

久 保 忠

(昭和57年3月27日受付)

ヒト絨毛組織における内分泌学的機構を窺知する目的で、ヒト妊娠性絨毛上皮腫に由来する BeWo 栄養膜細胞系 (BeWo 細胞系) を被検材料として用い、その細胞増殖およびヒト絨毛性 gonadotropin (hCG) 産生に及ぼす steroid hormone および抗腫瘍剤の効果について検索した。検討された添加物質は pregnenolone (PN), dehydroepiandrosterone (DHA), DHA sulfate (DHA-S), progesterone (P), estradiol (ED), testosterone (T), hCG, methotrexate (MTX), doxorubicin (DRC) であった。培養液は Waymouth 培地 MB 752/1, Gey 緩衝塩類溶液, ウシ胎児血清を、5:4:1 に混合して用いた。steroid hormone は ethanol に溶解し、ethanol の終末濃度が 0.2% になるようにして培養液に溶解した。BeWo 細胞 24 時間培養後の培養液中の hCG 濃度を latex 近赤外比濁法により測定した。steroid hormone は終末濃度 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度に、抗腫瘍剤は終末濃度 1, 5, 10, 50 ng/ml の各濃度に添加され、非添加対照群と比較検討された。BeWo 細胞系の細胞増殖は steroid hormone 添加により抑制された。その抑制の強さは、全体的にみて $\text{ED} > \text{P} > \text{PN} > \text{DHA} > \text{T} > \text{DHA-S}$ の順であった。DHA-S はほとんど抑制効果を示さなかった。P または ED を終末濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ で投与すると細胞増殖は停止した。すなわち、7 日間培養後の細胞数は培養開始時とほぼ同数であった。一方、無添加対照群では 7 日後には 20~30 倍に増加した。細胞 1 箇当り 24 時間の hCG 産生量は、P 添加の場合は添加 P 濃度の増加に従って減少したが、ED 添加の場合は濃度の増加に伴って急増した。DHA, DHA-S, T 添加は hCG 産生量にほとんど影響を与えなかった。また、hCG 添加は細胞増殖に対して無影響であった。MTX, DRC 添加は細胞増殖を強く抑制した。同一添加濃度では DRC の作用がより強かった。細胞 1 箇当たりの hCG 産生量は DRC の場合、添加濃度の上昇と共に急増した。さらに、絨毛組織の悪性度とそれに及ぼす steroid hormone の作用、hCG 産生との関連性などについて検討が加えられた。

Key words tissue culture, steroid hormone, antineoplastic, trophoblast, hCG production

ヒトにおいて胎盤は、いくつかの臓器に相当する機能を果している。すなわち、血液ガス交換の面からみれば、肺に相当する呼吸器官といえ、母体からの栄養摂取の面からみれば、個体の消化吸収器官にも類似しており、胎児の種々の老廃物を排泄する機能からみれば、腎に相当する器官といえる。さらに、内分泌面からは妊娠継続および分娩に不可欠な極めて重要な内分泌臓器としての役割を果している。

胎盤から分泌されるホルモンはヒト絨毛性ゴナドト

ロピン human chorionic gonadotropin (hCG), progesterone (P), estriol (ET), ヒト胎盤性泌乳ホルモン human placental lactogen (hPL) などであり、他に未確定であるが、さらにいくつかのホルモンが分泌されるとされている^{1,2)}。

これらのうち、P, hCG, hPL は胎盤内で産生分泌されるとされるが、ET はその前駆物質 precursor の sex steroid hormone から胎盤内で転換 convert されて ET となり分泌される。すなわち、胎生期には、胎児副腎

Effects of Steroid Hormones and Antineoplastics on Gonadotropin Production by Trophoblastic Tumor in Tissue Culture. **Tadashi Kubo**, Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. E. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

皮質網状層のいわゆる胎児層 fetal zone は極めて肥大増殖しており、そこから極めて大量の dehydroepiandrosterone (DHA) が硫酸塩 sulfate の形で分泌される³⁻⁷⁾。この DHA が ET となる⁸⁻¹³⁾。DHA が ET となるためには、 16α -hydroxylation, aromatization の酵素が必要であるが、胎盤では aromatization の酵素は存在するが、 16α -hydroxylase は欠ける。DHA sulfate (DHA-S) は胎児肝で 16α -hydroxylase により 16α -OH-DHA-S となり、胎盤において sulfatase により 16α -OH-DHA となる。さらに 16α -androstenedione となり、aromatization をうけて ET となる。

胎盤由来の ET, P は卵巣由来のそれらと全く同一物質であり、hCG は下垂体からの luteinizing hormone (LH) に作用面で類似点が多いが、内分泌学的調節機構の面からは、胎盤と間脳-下垂体-卵巣系とは極めて異質である。すなわち、間脳-下垂体-卵巣系においては、proteohormone と steroid hormone が同一臓器や同一部位から分泌されることはないが、胎盤では P, hCG とともに、syncytiotrophoblast 合体細胞栄養膜(合体細胞層 syncytium)から分泌されるとされている^{14,15)}。間脳-下垂体-卵巣系では、proteohormone と steroid hormone との間に 1 対 1 対応の negative feedback 機構が働いているが、胎盤においてはそのような徴候は認められない。

ホルモンの生理学的生物学的作用面でも、下垂体性 gonadotropin や卵巣由来の sex steroid については、対性器および性器外作用に関して、かなりの面で説明されているが、胎盤由来のホルモンについては、不明の点が極めて多い。

hCG の唯一の明確な作用は、妊娠初期に母体卵巣月経黄体 corpus luteum menstruationis に作用して、これを妊娠黄体 c. l. graviditatis に変化させ、黄体からの P の分泌を増大させることのみであり、他の作用は種々推測されながら現在全く不明である^{16,17)}。

妊娠週数が進み、胎盤由来の P が増量し、卵巣由来の P が臨床的に全く不要となり、両側卵巣を摘除しても妊娠分娩経過に全く異常が起らない妊娠中期・後期になっても、hCG はかなりの量分泌されている。

P が増量する時期に hCG 量は急減するが、その消長からみて両者間に feedback 作用があるとは推定し難い。

妊娠時の P は非妊時の約 100 倍の量が分泌され、その作用としては、脱落膜の機能保持、子宮筋 tonus の低減、oxytocin の作用の block、乳腺分葉の増加、肺胞換気量の増大、腸管・輸尿管などの平滑 tonus 低減などの作用が認められている。

一方、胎盤由来の ET の作用としては、脱落膜・子宮

筋の肥大作用、乳腺・乳管の発育、子宮頸管成熟などの作用が認められているが、非妊時の約 100 倍の分泌量を考えると、他に何らかの重要な作用を有していると考えられる。

また、卵巣では ET は estrone (EO), estradiol (ED) から convert され卵巣で直接産生分泌されるが、胎盤ではなぜ、 16α -hydroxylase が欠け、全く別の合成経路を介して ET に convert されるのか、また、そのために必要な DHA の産生部位が、何故に胎児副腎皮質でなければならないのか、胎児副腎皮質由来の DHA は胎盤での ET 産生のための precursor としての役割以外に、何の重要な生理学的意義も有しないのかなど、種々の問題が胎児-胎盤系の内分泌機構には含まれている。

これらの未解明の面を窺い知る目的で、われわれもいくつかの検索を行ってきたが、より基礎的で、かつ複雑性のより少い in vitro における実験方法の面からも、これら絨毛組織の内分泌学的性質、さらには胎盤における内分泌学的機構について検討を加える目的で、本研究を企画した。

絨毛組織の生理学的内分泌機構を知る上では、正常絨毛の組織培養が最も適しているが、今日なお正常絨毛の継代培養は可能ではない¹⁸⁻²⁰⁾。従って、被検材料としては、現在、組織培養の可能なヒト絨毛細胞である、妊娠性絨毛癌の株細胞を用い、progesterone, estrogen, DHA, testosterone などのホルモンを添加投与した場合の細胞の増殖状態、hCG 産生量の変動、また、抗腫瘍剤添加の動態などについて検討を加えた。

材料および方法

被検材料としては、ヒト妊娠性絨毛上皮腫に由来する BeWo 栄養膜細胞系 trophoblastic cell line (以下 Bewo 細胞系)を用いた。

BeWo 細胞系は、ヒトの妊娠性の組織から分離樹立された細胞系であり、trophoblast 同様の内分泌学的特性を有している^{14,21,22)}。

すなわち、ヒト絨毛性ゴナドトロピン human chorionic gonadotropin (hCG)、ヒト胎盤性泌乳ホルモン human placental lactogen (hPL)、progesterone (P)、estrogen (E) を分泌し、従って、ヒト絨毛細胞の生物学的作用を in vitro において検索できる被検対象および指標として適しているものとみなされた。

継代培養には、約 50 ml のガラス又はプラスチック製角型組織培養フラスコを用い、培養液としては、原則として、下記組成の Waymouth 培地、Gey 緩衝塩類溶液、ウシ胎児血清の 3 者を、5:4:1 の比率に混合して用いた。また、継代培養操作における細胞の剥離分散には、後記のごとき trypsin-EDTA 溶液を使用した。

Waymouth 培地は Waymouth's medium MB 752/1 の粉末培地を規定に従い蒸留水 1 l に溶解した。これに、炭酸水素ナトリウム NaHCO_3 0.75 g, 硫酸 kanamycin 100 mg を加え、メンブランフィルター membrane filter (東洋濾紙 TM-2, 孔径 $0.45 \mu\text{m}$, $47 \text{ mm}\phi$) を用いてろ過して使用した。

Gey blanced salt solution (BSS) 緩衝 (平衡) 塩類溶液の処方は次の如くであった。

NaCl	8.00 g/l
KCl	0.38
CaCl_2	0.13
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.21
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	0.30
KH_2PO_4	0.025
glucose	0.25
phenol red	0.005
NaHCO_3	0.75
気 相	空 気

これに硫酸 kanamycin 100 mg/l を加え, membrane filter (東洋濾紙 TM-2) でろ過した。なお, 参考とした原処方では, NaHCO_3 1 g/l であったが, pH がアルカリ側に強くなったので, 0.75 g/l に変じた。

ウシ胎児血清 fetal bovine serum (FBS), コウシ血清 calf serum (CS) (Flow Labor.) は非働化せずに使用した。

trypsin - EDTA 溶液 (TE 液) の組成は次の如くであった。なお, これらには trypsin 1 : 250 (Difco Labor.); disodium ethylene diamine tetraacetate エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (EDTA, 和光純薬工業) が用いられた。

trypsin	2.0 g/l
EDTA	0.4
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na_2HPO_4	1.15
KH_2PO_4	0.2
phenol red	0.005

これに硫酸 kanamycin 100 mg/l を加えアスベストろ過板 asbestos filter (東洋濾紙, No.85 SB) でろ過し, 使用に供した。また, 上記処方中の量の NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 を含む, いわゆる PBS (-) (phosphate buffered saline 磷酸緩衝生理的食塩水 (-)) を予め作製し, それに trypsin, EDTA などを溶解してろ過した。

培養においては, 細胞数を 10^5 細胞/ml となるよう調製し, 50 ml のプラスチック製培養フラスコに入れ, 37°C で培養した。

継代培養は次の如くに行った。培養 6~7 日に細胞が増殖して癒合性 (confluent) になった培養フラスコの古い培養液を捨て, 予め 37°C に加温した TE 液各 5 ml で 2 回細胞表面を洗い, 液を捨て 37°C に数分間保った。細胞が剥離し始めたら, 約 2 ml の培養液を入れ, 25 G 注射針付注射器で静かに 5~6 回 pumping をくり返した。このようにすると, 細胞は個々に充分分散し, 単個細胞 single cell となった。激しい操作, pumping 回数の増加, 26 G 以上の細い注射針の場合は, 破壊細胞が増加し, また, 培養液を入れる時期が遅れると, 死滅細胞が増加した。

上記操作を 3~4 箇の培養フラスコについて同時に行い, これを集め, 適当量の培養液を加え, 総量約 40 ml の単個細胞浮遊液 single cell suspension とした。

このようにすると, 細胞の破壊も少なく, また, 一定の細胞密度の浮遊液作製に好適であった。液量が 100 ml を越えると, 細胞傷害が起る傾向が増強された。

このようにして得られた細胞浮遊液の細胞密度を, 血球計算板で計算し, 適量の培養液で希釈して, 細胞数 10^5 /ml 近似の細胞浮遊液を作り, これを特別に作製したスポイト付ピペットで正確に 5 ml とり, 培養フラスコに分注し, 密栓して 37°C に保った。培養フラスコは Nunc (N-1461) を用いた。これらの細胞浮遊液を継代培養および実験被検細胞として供した。分注に用いたピペットは先端が細いと細胞を傷害するので, ある程度の太さのものとした。また, 培養フラスコに分注後, 37°C の恒温器に静置するまでの時間にバラツキがあると, 実験条件が一定にならないと危惧されたので, 分注を 2 箇の培養フラスコについて行う毎に, これを pair として直ちに恒温器内に静置し, 一方を実験群として, 他方を対照または比較すべき実験群として実験を行った。

培養液の更新は 24 時間後の 1 日後, および 3, 4, 6, 7 日後に行った。

このようにして培養された BeWo 細胞について, 培養液への種々のホルモンおよび, 抗腫瘍剤の添加が, 細胞増殖に及ぼす影響について検討を加え, また, その場合の, 培養液中の hCG 濃度を測定し比較した。

steroid hormone としては, pregnenolone (PN) (Sigma), DHA (Merck), DHA-S (Merck), testosterone (T) (Sigma), P (Sigma), estradiol (ED) (Sigma) が添加され, さらに hCG (Organon), また, 抗腫瘍剤として methotrexate (MTX), doxorubicin HCl (DRC) の添加時の効果が検討された。

steroid hormone の添加においては, 予めこれを ethanol に溶解した後添加された。ethanol 終末濃度は 0.2% 以下となるようにして添加された。なお対照群に

も同濃度の ethanol が添加された。この濃度では、細胞増殖に影響しないことが予め確認された。

実験においては、増殖に及ぼす影響を知るため、細胞密度を測定するとともに、培養液中の hCG を測定するために、24 時間の培養液を採取し、それに含まれる hCG 量を測定し、細胞 1 箇、24 時間当りの hCG 産生量を算出した。すなわち、各種濃度の被検添加物質を含む培養液に、BeWo 細胞を浮遊し、恒温器内に静置して、実験を開始した日を第 0 日とし、第 3 日に培養液を交換し、その後 24 時間後にその培養液を採取し、その一部を -80°C に凍結保存し、hCG 測定に供した。同様の操作を第 6 日から 24 時間の培養液についても行った。また、hCG 測定用の培養液に交換する際、すなわち、第 3 日、第 6 日の培養液交換に際しては、それ以前に産生された hCG を十分に除去する目的で、細胞を 3 回以上培養液で洗った後、新しい培養液を注入した。

hCG の測定には、近年開発されたラテックス近赤外比濁法 Latex photometric immunoassay (LPIA) を用いた^{23,24)}。本法は、被検液中の hCG を抗原抗体反応により凝集させる、免疫学的方法を応用し、その免疫凝集物を、特製の比濁計 (三菱化成工業 Type P 1) で定量する方法であり、radioimmunoassay 法 (RIA) と異なり、放射性物質を全く用いないので、随所で実験ができ、定量法も比較的簡便で精度・再現性など測定結果の面でも、充分満足できる結果が得られた。

本実験では、1 回の測定に 0.6 ml の被検液が供された。予め作製された、hCG 濃度と吸光度の増加速度との関係を表わす、標準曲線は図 1 の如くであった。図

に示す如く、両者の対数の間には、ほぼ直線的関係がみられ、本実験における hCG の測定に適する濃度は hCG 0.04~3 IU/ml の範囲であった。これより高濃度の試料は、適宜希釈して定量を行った。

標準曲線は毎回作製され、それに従って hCG 量が算出された。なお、本実験に使用された hCG 標準品は 1525 IU/mg のものであった。

細胞密度の算定に当っては、1 被検体の算定には 1 培養フラスコを供した。すなわち、被計測検体培養フラスコの細胞に、前記同様の TE 液処理を行い、全体を一定量の単個細胞浮遊液とし、その細胞浮遊液中の細胞密度を、血球計算板を用いて算出した。1 検体について 6 回以上算出し、平均値をもって、その検体の細胞密度とした。一般に、細胞密度が小さい場合は、細胞浮遊液作製時、希釈培養液量を多くすると、密度の濃淡の偏差が大きくなる傾向があったので、液量を適宜調節し、また、8 回以上算出した。本実験条件下では、一般的に、1 培養フラスコについての単個細胞浮遊液量は 2~20 ml、細胞密度は $5\sim 50 \times 10^4/\text{ml}$ 程度とするのが、細胞密度算定に便であった。

同時に 5 箇の培養フラスコについて、細胞濃度を算出した場合のバラツキについては、細胞密度の大小によりやや異なるが、その標準偏差が 1.2~1.7% であった。誤差範囲を標準偏差の約 3 倍と見積ると $\pm 5\%$ 程度の誤差となり、充分満足すべき値とみなされた。

培養液中に放出された hCG 量の表現には、細胞 1 箇当り 24 時間に産生した量とした表現を用いた。この場合、培養液中の細胞数は、刻々変化しており、どの時点の細胞密度を基準にするかの問題があるが、本実験では、培養 24 時間の前後の細胞密度を算定し、その間、細胞数が指数位的に増殖したものとみなし、その平均的数値、すなわち、積分の平均値を算出し、それをもって、その間の細胞密度の代表値として、細胞 1 箇当りの hCG 産生量を算出し、その値を、その被検培養細胞の hCG 産生量として、他の実験条件群のものと比較した。

各培養実験においては、まず、実験用添加物の入らない培養液をもって作製された、細胞密度 $10^5/\text{ml}$ の単個細胞浮遊液を、正確に 5 ml ずつ、予め準備された数 10 箇の培養フラスコに分注し、 37°C に 24 時間静置した。24 時間後の細胞数は 1 培養フラスコ当り約 30×10^4 前後に減少した。

この 24 時間後を実験第 0 日とし、培養フラスコを群分けし、各群それぞれ所定の培養液と交換し、実験を開始した。培養液交換は、前記の如く第 3, 4, 6, 7 日であった。

培養フラスコ内の総細胞数の変動の比較においては、

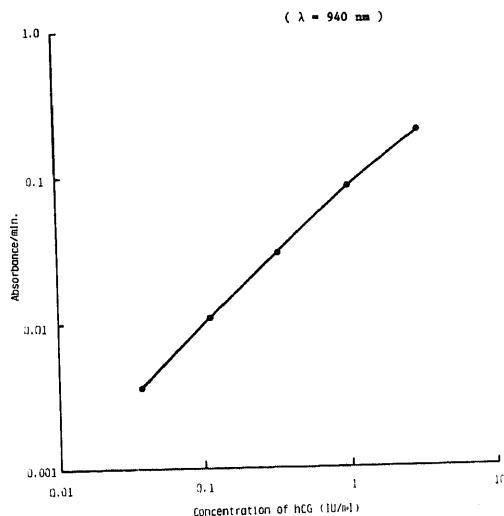


Fig. 1. Calibration curve for hCG

実験第0日の細胞数を1とし、それとの比で表現した。各実験においては、それぞれ同実験を3〜5回繰返し、その平均値を求めて比較検討した。各種添加物を添加した実験群は、原則として、各種濃度群4群および無添加対照群の計5群について比較した。添加 steroid hormone 濃度は、mol 濃度で表現する のも一法であるが、本実験では一般的な便のため、実重量の終末濃度で表わした。

成 績

I. 培養 BeWo 栄養膜細胞の増殖に及ぼす ethanol 添加の影響

終末濃度の 0.1, 0.15, 0.2, 0.25% の割合になるように ethanol を培養液に加え、BeWo 細胞を培養した場合の細胞増殖速度は ethanol 無添加の対照群のそれと、ほとんど全く差が認められず、細胞自身および細胞集団の形態学的変化も、ほとんど認められなかった。この結果から steroid hormone の ethanol 溶液の ethanol 終末濃度が 0.2% となるようにして添加した。

一方, ethanol 終末濃度が 0.5% となると, 細胞増殖は, 対照群の細胞数を 100 とすると, 平均 86.5 で, ある程度増殖が抑制された。1% では 62.7 とかなりの抑制がみられた。細胞の形態学的変化, 細胞破壊もみられ, 1.5% では, 4 日後にはほとんどすべての細胞が破壊された。

II. 培養 BeWo 栄養膜細胞の増殖に及ぼす hCG 添加の影響

hCG を 200 IU/ml の終末濃度で培養液に添加して培養を行ったが, 7 日間の培養の結果, 細胞の増殖にはほ

とんど全く影響はみられなかった。

III. 培養 BeWo 栄養膜細胞の増殖に及ぼす steroid hormone 添加の影響

培養 BeWo 栄養膜細胞培養液に, PN, P, E, DHA, DHA-S, T などの各種 steroid を, 終末濃度 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に添加し, 7 日間培養した場合の, 細胞増殖に及ぼす影響について検索し, 次の如き結果を得た。

A. BeWo 細胞の増殖に及ぼす pregnenolone 添加の影響

P および DHA の precursor である pregnenolone (PN) を, 培養 BeWo 細胞の培養液に添加した場合の細胞増殖は図 2 に示す如くであった。横軸に培養日数を示し, 0 は PN 添加投与前であり, 1〜7 は PN 添加後の日数を示した。PN 添加第 3 日からの 24 時間および第 6 日からの 24 時間の培養液について, 培養液に含有された hCG 量を測定した。縦軸には, PN 添加後の培養フラスコ中の細胞数と PN 投与前のそれとの比をとり, その比を 10 を底とした対数で表わした。すなわち, $-1, 0, 1, 2$, などの数字は, 比が $10^{-1}, 10^0, 10^1, 10^2$ などであったことを意味している。

PN を添加せず, 終末濃度 0.2% の ethanol のみを添加した対照群では, 細胞数は指数数的に, すなわち, 片対数グラフ上ではほぼ直線的に急激な増加を示し, 第 7 日では, 第 0 日の平均 19.4 倍となった。PN 添加により, 増殖はある程度抑制され, 第 7 日の第 0 日に対する増加比は, PN 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 群では平均 16.6 倍とやや低下し, 5 $\mu\text{g/ml}$ 群では平均 7.6 倍であった。PN 濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ となると平均 1.7 倍と細胞増殖はほと

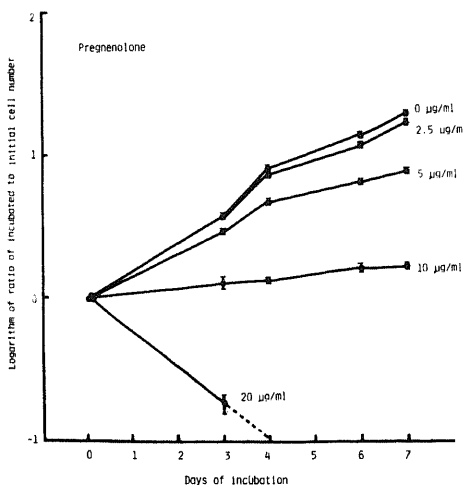


Fig. 2. Effect of addition of pregnenolone on cell population in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

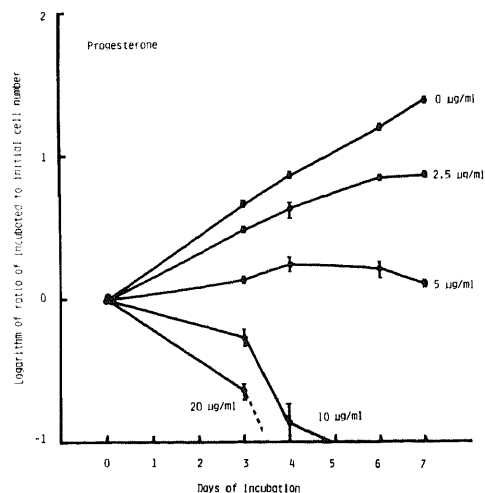


Fig. 3. Effect of addition of progesterone on cell population in cultured human choriocarcinoma cell (BeWo line)

んど停止した。20 $\mu\text{g/ml}$ では、第3日で約0.17倍すなわち約1/5と激減した。

B. BeWo細胞の増殖に及ぼす progesterone 添加の影響

progesterone (P) 添加が、細胞増殖に及ぼす影響は、図3に示す如くであり、PNに比しBeWo細胞に対する増殖抑制効果が大きかった。第7日の細胞数の第0日のそれに対する比は、P非添加対照群では平均24.0倍であったが、P 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 添加群では平均7.3倍と対照群の約1/3に低下した。P濃度が5 $\mu\text{g/ml}$ になると平均1.3倍と細胞増殖は停止し、10 $\mu\text{g/ml}$ では第3日で平均0.55倍、20 $\mu\text{g/ml}$ では平均0.23倍と減少した。

C. BeWo細胞の増殖に及ぼす estradiol 添加の影響
estradiol (ED) 添加の場合は図4に示す如くであり、第7日の増加比は平均21.6倍であり、ED 2.5および5 $\mu\text{g/ml}$ 添加の場合のそれらは、それぞれ平均11.0および0.87倍であった。また、ED 10および20 $\mu\text{g/ml}$ 添加の第3日の増殖比率は、それぞれ平均0.16および0.07倍と激減した。

ED添加の場合のBeWo細胞の増殖に及ぼす抑制効果は、同一量であれば、Pの場合よりやや強い傾向が認められたが、全体の増殖速度については、ほぼ同様の結果が得られた。

D. BeWo細胞の増殖に及ぼす dehydroepiandrosterone 添加の影響

dehydroepiandrosterone (DHA) 添加の場合の成績は図5に示す如くであった。第7日の増殖比率は、対

照群、DHA 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加群それぞれ、平均30.1, 25.6, 16.1, 7.6倍であり、軽度のBeWo細胞増殖抑制作用を示した。また、DHA 20 $\mu\text{g/ml}$ 添加の第4日の比は、平均2.0倍で対照群のそれは11.4であった。

E. BeWo細胞の増殖に及ぼす dehydroepiandrosterone sulfate 添加の影響

DHA-S添加の場合の成績は図6に示す如くであ

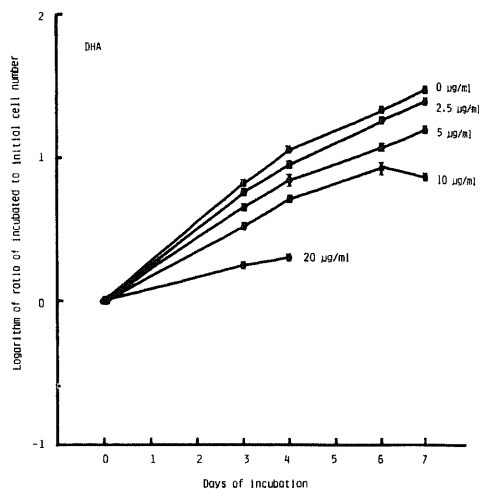


Fig. 5. Effect of addition of DHA on cell population in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

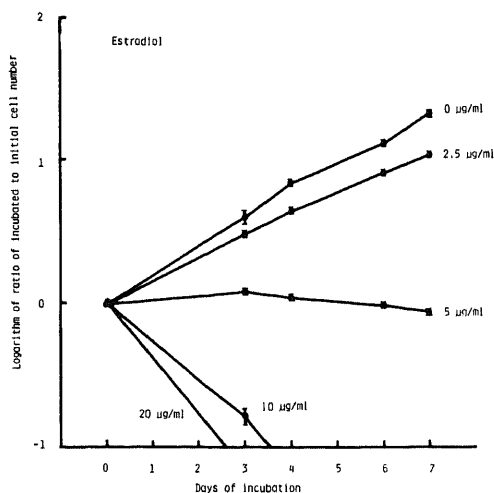


Fig. 4. Effect of addition of estradiol on cell population in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

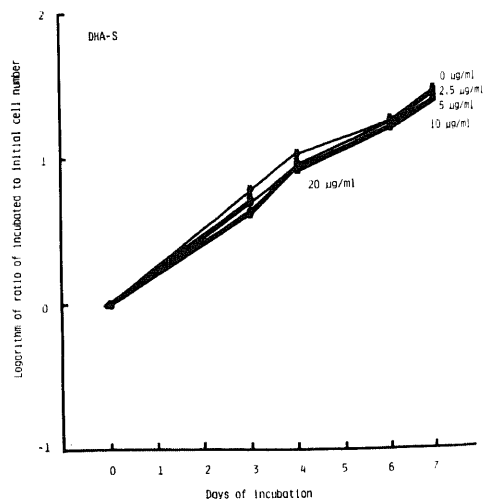


Fig. 6. Effect of addition of DHA-S on cell population in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

り、著明な変化は認められなかった。対照群、DHA - S 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の第7日の比はそれぞれ、平均 28.8, 26.6, 26.8, 25.4 倍であり、DHA - S 20 $\mu\text{g/ml}$ の第4日の比は平均 8.5 倍であり、対照群のそれは 10.4 倍であった。

F. BeWo 細胞の増殖に及ぼす testosterone 添加の影響

testosterone (T) の添加の場合の結果は図7の如くであり、DHA 添加とほぼ同様の BeWo 細胞増殖抑制結果を示した。対照群、T 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の第7日の比は、それぞれ平均、14.9, 12.4, 10.5, 5.7 倍であり、T 20 $\mu\text{g/ml}$ 添加の第4日の比は平均 0.87 倍であり、対照群のそれは 4.2 倍であった。

IV. 培養 BeWo 栄養膜細胞の hCG 産生量に及ぼす steroid hormone 添加の影響

培養 BeWo 栄養膜細胞培養液を第3および6日に交換し、それぞれ24時間後にその培養液を採取し、液中の hCG 濃度を測定し、同時にその24時間の前および後の細胞密度を測定し、これらに及ぼす添加各種 steroid の影響を検討し、次の如き結果を得た。

A. BeWo 細胞の hCG 産生に及ぼす pregnenolone 添加の影響

PN を添加した場合の第3日よりの24時間の培養液中の hCG 濃度の変化は、PN 添加濃度が増大するに従って減少した。PN 終末濃度 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ における hCG 濃度は、それぞれ対照群の約 2/3, 1/2, 1/5 と減少した。第6日より24時間のものでもほぼ同様の傾

向を示した。本実験では PN を 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加し、第6日より24時間のものでも hCG の産生が認められた。

前記の如く、BeWo 細胞増殖は PN 添加濃度の増加と共に抑制傾向が強くなり、添加 PN 濃度が大きいほど細胞密度は小となった。

上記の如く、添加濃度の増加と共に hCG 濃度および細胞密度両者共減少したが、両者の関係を推定する目的で、細胞1箇当り24時間の hCG 産生量の算出を試みた。この場合、細胞密度や細胞の広がり、培養液との接触、培養液中の hCG の濃度勾配、また添加物による細胞増殖抑制ないし細胞の損傷・破壊など種々の影響が加わり、実験条件はかなり複雑となると思考されるが、一応単純に、培養24時間の培養フラスコ中の hCG 総量を総細胞数で除し、得られた数値を比較検討した。なお、細胞数は、前記の如く24時間の前と後の数から、それが指数位数的に増加したと仮定して、その積分の平均値を求め、それを平均細胞数として、これをもって hCG 量を除した。このようにして得られた結果は図8に示す如くであった。横軸には添加 PN 濃度を示し、縦軸には細胞1箇当り24時間のいわば hCG 産生量を $\mu\text{IU}/\text{細胞} \cdot 24 \text{ 時間}$ を単位として表わした。またこのようにして表わされたものを産生量と表現するのは必ずしも適確ではないと思われるが本論文では一応そのように表現した。

第3日のものでは、添加 PN 濃度が 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ と増加しても、細胞1箇当りの数値には著明な変動はみられず、PN 添加によって細胞増殖は抑制されるが、細胞の hCG 産生分泌能は抑制されないものと推定された。また、第6日のものについての結果もほぼ同様であった。

B. BeWo 細胞の hCG 産生に及ぼす progesterone 添加の影響

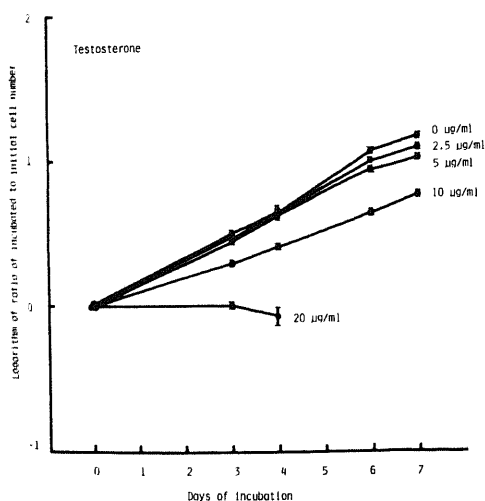


Fig. 7. Effect of addition of testosterone on cell population in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

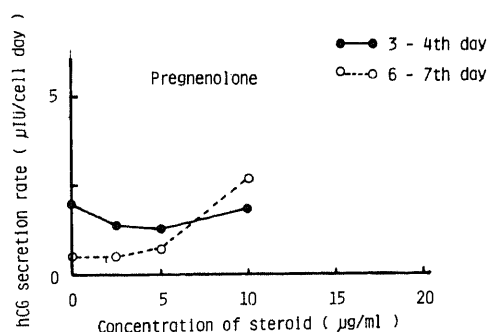


Fig. 8. Effect of pregnenolone on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

P 添加による BeWo 細胞密度および培養液中 hCG 濃度は、添加 P 濃度が増加するに従って共に減少したが、各濃度における値の非添加対照群のそれに対する減少の割合は、細胞密度の減少割合よりも hCG 濃度の減少割合の方が強く、10 $\mu\text{g/ml}$ 添加では、P では ED の場合に比し、より多くの細胞がなお存在しているのに拘らず、hCG 濃度は測定感度以下の濃度に減じた。P 添加の場合の結果は図 9 に示す如くであったが、P 添加により BeWo 細胞の hCG 産生分泌能は抑制される傾向が認められた。

C. BeWo 細胞の hCG 産生に及ぼす estradiol 添加の影響

ED 添加の場合も、BeWo 細胞密度および培養液中 hCG 濃度は両者共、添加 ED 濃度が増加するに従って減少したが、P 添加の場合と異なり、5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の添加濃度では細胞密度減少の割合が著しく、それに比し

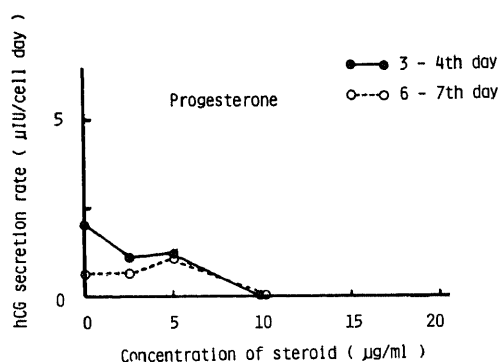


Fig. 9. Effect of progesterone on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

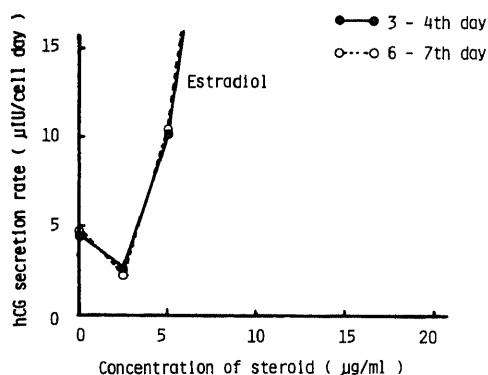


Fig. 10. Effect of estradiol on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

て hCG 濃度の減少割合は相対的に強くなく、従って ED 添加の場合の細胞 1 箇当りの hCG 産生量は図 10 に示す如くに、5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の ED 濃度以上では急増した。

D. BeWo 細胞の hCG 産生に及ぼす DHA 添加の影響

DHA 添加の場合では、添加 DHA 濃度の増加と共に

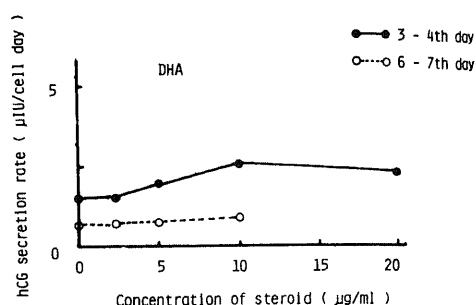


Fig. 11. Effect of DHA on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

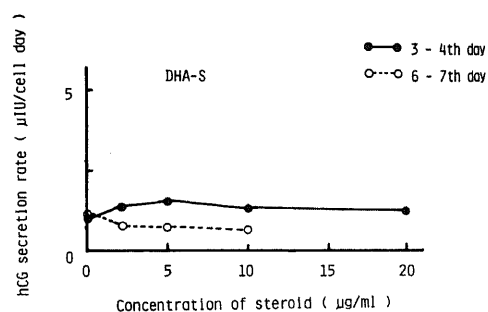


Fig. 12. Effect of DHA-S on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

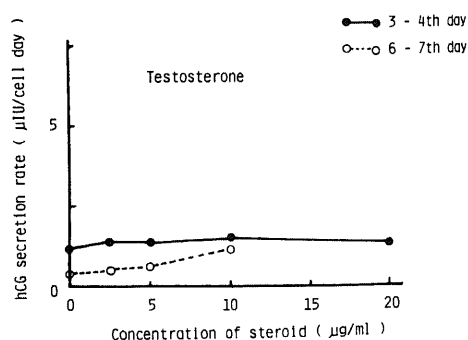


Fig. 13. Effect of testosterone on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

hCG 濃度は減少したが、その減少割合は細胞増殖抑制の割合とはほぼ同一であり、従って細胞 1 箇当りの hCG 産生量は図 11 に示す如く、添加 DHA 濃度に拘らず、ほぼ一定であった。

E. BeWo 細胞の hCG 産生に及ぼす DHA・S 添加の影響

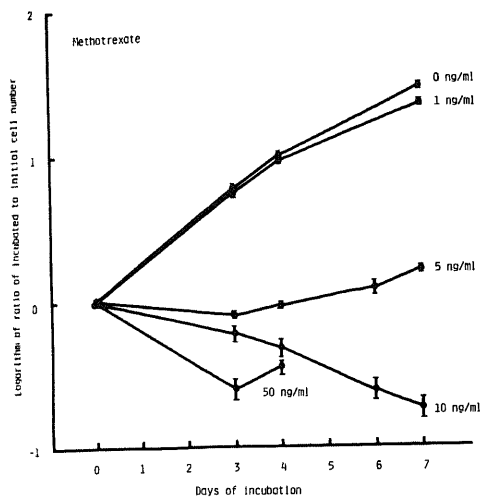


Fig. 14. Effect of addition of methotrexate on cell population in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

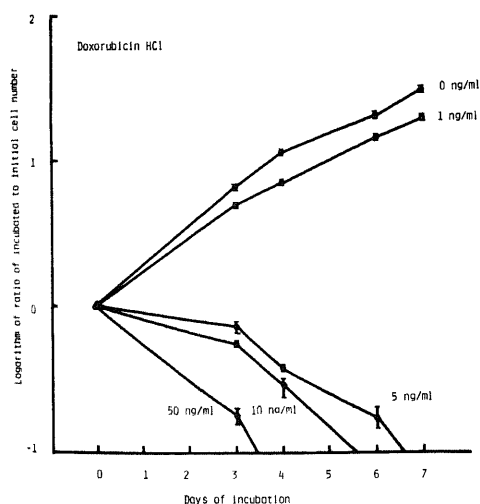


Fig. 15. Effect of addition of doxorubicin HCl on cell population in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

DHA・S 添加の場合は、その添加濃度が増加しても hCG 濃度はほとんど変化をせず、細胞 1 箇当りの hCG 産生量も図 12 に示す如く、ほぼ同一であった。

F. BeWo 細胞の hCG 産生に及ぼす testosterone 添加の影響

T 添加の場合は、hCG 濃度は添加 T 濃度の増加と共に軽度低下したが、細胞 1 箇当りの hCG 産生量は図 13 に示す如く、ほぼ一定の値を示した。

V. 培養 BeWo 栄養膜細胞の増殖および hCG 産生量に及ぼす抗腫瘍剤添加の影響

BeWo 栄養膜細胞は絨毛癌より分離樹立された細胞系で、本来悪性細胞であるので、これに対する抗腫瘍剤 methotrexate (MTX) および doxorubicin HCl (DRC) の効果について検討を加えた。MTX, DRC

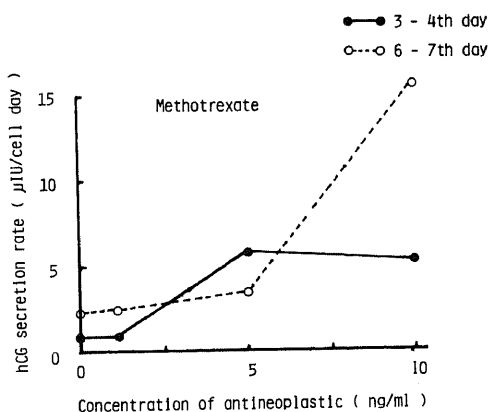


Fig. 16. Effect of methotrexate on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

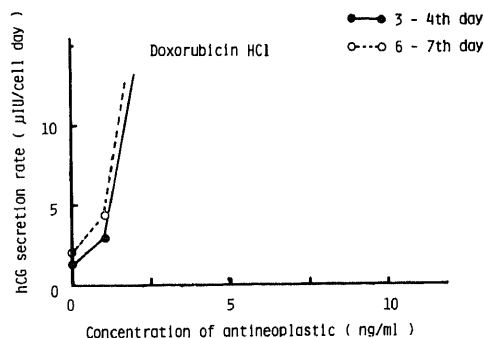


Fig. 17. Effect of doxorubicin HCl on hCG secretion rate in cultured human choriocarcinoma cells (BeWo line)

共に終末濃度 1, 5, 10, 50 ng/ml を添加した。その場合の細胞増殖に及ぼす影響は、図 14, 15 に示す如くであった。

MTX 1 ng/ml 添加ではほとんど増殖抑制効果はみられなかった。5 ng/ml 添加では、細胞数の増加が停止ないしは軽度減少傾向を示したが、培養 5~6 日目頃より細胞数の増加すなわち増殖傾向が現われた。10 ng/ml 添加では、第 7 日で当初細胞数の約 1/10 に減じ、50 ng/ml ではさらに減少した。

一方、DRC 添加では、1 ng/ml の場合の増殖抑制効果はさほどではなかったが、5 ng/ml 添加では MTX の 10 ng/ml 添加より強い細胞減少作用を示し、10, 50 ng/ml ではさらに著しかった。

これらの場合の hCG 濃度は、MTX 添加では添加 MTX 濃度が増加すると漸減した。一方、細胞密度は MTX 添加によりかなり減少したから、1 細胞当たり 24 時間の hCG 産生量は、MTX 添加濃度の増加に従いかなり増加した。また DRC 添加では、添加 DRC 濃度が増加しても hCG 濃度はさほど変化せず、漸減する例もあったが、逆に漸増するものもあった。DRC 添加により細胞密度は相当減少したから、1 細胞当たりの hCG 産生量は、DRC 添加濃度の増大に伴って、hCG 濃度は著明に増大した。

考 察

胎児において副腎の体重に対する相対的重量が、他臓器や成人のそれに比して極めて大きいことは古くから知られており、また、その増大している皮質部分は形態学的にも特異であり、胎児層 fetal zone と呼称されてきた³⁾。いわゆる fetal zone の生理学的意義の一つとしては、大量の副腎性 androgen の分泌がある⁴⁻⁷⁾。その主要成分は dehydroepiandrosterone (DHA) とくにその硫酸結合型 sulfate (DHA-S) の形で分泌されるとされ、その分泌は胎児下垂体からの ACTH に主に支配されるとされている。

一方、妊娠中は母体内には大量の estriol (ET) が存在し、子宮脱落膜・筋層、子宮頸部組織、膈上皮、乳腺、その他の組織に種々の妊娠・分娩維持に必要な生理学的作用を呈している。この ET は胎児副腎皮質から分泌される DHA に由来し、その conversion は胎盤絨毛膜組織でされる⁸⁻¹³⁾。

胎盤絨毛膜組織では栄養膜 trophoblast (TB) がホルモン産生、転換、分泌の場となる。TB は、形態学的に cytotrophoblast 細胞 (性) 栄養膜 (CTB) (Langhans 細胞層) と、syncytiotrophoblast 合胞細胞 (性) 栄養膜 (STB) とに 2 分されるが、それらがどのような内分泌学的役割を果しているかについては、その詳

細はなお不明である²⁵⁻²⁷⁾。

完成された hCG は STB に局在するから、少なくとも hCG の分泌には STB が関与していることは明らかとみなされる^{15,28)}。一方、CTB の急激に増殖する妊娠初期に一致して、絨毛膜組織からの hCG 分泌量が急増し、CTB の増殖減退に一致して、hCG 分泌量が低下することや、STB は形態面や増殖分裂面で、他の内分泌機能を有する一般細胞とかなり異なっていることなどから、CTB が胎盤における内分泌面で重要な役割を果しているものと推定されている。

また、同一部位にある 1 ないし 2 種類の細胞から、hCG, hPL, P, ET など数種の proteohormone と steroid hormone とが分泌されていることも、胎盤内分泌面の特殊性の一つである。

これら胎盤内分泌面の研究には、古くから種々の方法が用いられ、胎盤組織 homogenate からのホルモン抽出分析、絨毛膜組織切片の短時間培養、胎盤還流による研究などがあり、種々の新しい知見が得られてきているが、実験方法や条件の制限、限界や困難性のために一つの限界を超えられない現況である。また動物実験も多く行なわれているが、胎盤の形態学的、機能的機構に種特異性が強く、動物実験で得られた結果と、ヒトにおける場合との関連性は、かなり稀薄となるものと推定される。

出来るだけ単純な実験条件下で、組織の内分泌面を研究する方法の一つに、長時間 in vitro で組織培養をし、種々実験条件を人為的に変えてその反応をみる方法がある。一方、正常な trophoblast の継代培養は、現在不可能である。今日、継代培養しうるのは、悪性の trophoblast のみである。本実験で被検材料とした BeWo 細胞系もヒト妊娠性絨毛上皮腫に由来する悪性の細胞である²⁹⁻³¹⁾。この場合、悪性 trophoblast から得られた結果から正常 trophoblast の場合を類推することは、必ずしも容易ではないが、かなりの参考になるものと思われる。BeWo 細胞は合胞細胞ではなく単一細胞 unicellular であるが、正常な STB 同様かなりの hCG を分泌する。

BeWo 細胞は、一種類の細胞であり、その一種類の細胞から hCG, hPL, progesterone, estrogen を明らかに分泌している。このように単一細胞から proteohormone と steroid hormone の両者を同時に分泌することは、胎盤由来細胞にのみみられる特異なことで、生体内の他の内分泌臓器にはみられない現象である。この細胞内のホルモン合成、転換、分泌機構は、胎児副腎皮質の DHA 分泌機構と共に、産科内分泌学面で極めて重要な興味ある問題である。

BeWo 細胞の培養では pH 低下が比較的速く、本実

験では培養液中に磷酸緩衝液が含まれているが、培養フラスコ中の細胞密度の大小に極端な差があれば、相互間に多小の pH の相違も現われるものと思われ、実験条件のより厳密化のためには、混合緩衝液の強さなどの検討も必要と思われた。

steroid hormone は水に難溶性であるので、予め ethanol に溶解した後、培養液に滴下し充分混合した。本実験で使用する培養液には血清として FBS が 10% 混和されているので、steroid hormone の溶解状態は、生体内血清中における溶解状態に近似しているものと考えられた。組織培養における ethanol 添加の終末濃度については、細胞の種類や実験条件により種々であるが、一般に 1% 以下のものが多い。BeWo 細胞に関しては PN を ethanol 終末濃度 1% となるようにして添加した実験などがあるが³²⁾、本実験の結果からは、過量にすぎるとみなされた。

steroid hormone 添加濃度としては、mol 濃度とするのが実験条件としては厳密であるが、本来、steroid hormone の生物学的作用量は互いに order が異なり、たとえば生体では一般に P は ED の 1000 倍の単位で作用する。また分子量は ED 272, DHA 288, T 288, P 314, PN 316, DHA-S 368 とある程度の差はあるが、それら各 steroid hormone の作用の傾向と比較する上では、必ずしも著明な差ではないともいえる。従って、本実験では一応、重量濃度とし、各 steroid hormone すべて同一濃度のものについて比較検討を行った。

本実験では、培養中増殖した細胞数の算定に 1 回 1 培養フラスコを供したが、培養フラスコ間の偏差をより小さくする目的で、恒温器内の温度差がないように留意し、各シリーズ培養フラスコをなるべく at random に恒温器内に置くよう留意し、数台の恒温器を同時に用いる場合にはそのような点に特に注意した。別の実験で培養温度が数度低下すると、実験結果に明らかな差の生ずることを確かめたが、そのような点からも恒温器内に静置する部位に留意することは、実験条件を一定にする上で重要なこととみなされた。一つの実験において、すべての培養フラスコを一つの恒温器内に静置し得れば実験条件をより良くすることができるが、そのためには培養フラスコの大きさ、形状を選択することも一つの要素となる。また、本実験では、37°C におけるものについてのみ比較を行ったが、37°C は BeWo 細胞にとっては至適温度であるので、非添加対照群の細胞増殖速度や hCG 産生量が、細胞の有する能力の最大限であって、何らかの促進物質を添加しても、その至適温度ではそれ以上増加値となって現われないこともあると考えられる。従って、これらに対する促進物質の存在を検索する実験の場合には、培養温度や培

養液組成などの培養条件をある程度低劣なものとして、それら細胞の有する能力の一部を潜在能力化した条件下で、実験を行うのが適しているのではないかと思われた。

hCG 測定には、免疫凝集物を比濁計で測定する新しい方法を選択したが、本法は放射性物質も全く使用せず、また、簡便で再現性も良好であったので、本実験などの目的には極めて適していると考えられた^{23,24)}。

hCG が BeWo 細胞増殖にどのような影響を与えるかを検討する目的で、終末濃度 200 IU/ml の hCG を添加したが、生体内では悪性絨毛組織は正常絨毛膜組織の数倍ないし数十倍の hCG を分泌するから、組織培養においても、もし正常絨毛膜組織のまま継代培養が可能とすれば、BeWo 細胞など悪性細胞はそれらより相当大量の hCG を分泌しているものであろう。正常妊婦血中の hCG 濃度は、最高値の妊娠 7~10 週では 50~100 IU/ml である³³⁻³⁵⁾ これらから、hCG 添加濃度をとりあえず 200 IU/ml とした。この値でほとんど全く影響がみられなかったので、それ以上の値については実験を省略した。

hCG を分泌した細胞が、自己の分泌した hCG により影響を受けることは無いのかもしれないが、一般生体では内分泌学的に feedback 関係をもつ proteo-hormone と steroid hormone を同時に分泌する BeWo 細胞においては、何らかの影響を受けるということも絶対無いとも断言しきれない。hCG は生物作用面では黄体化ホルモン luteinizing hormone (LH) と極めて類似しており、臨床的にも、排卵促進に LH の代りに hCG が用いられ、有効な成績を示しているが、大量の P 投与が LH を抑制するように、大量の P が hCG 分泌を抑制するという生体における実験的根拠は乏しい。ただ、妊娠 11 週頃以降の急激な hCG 分泌低下は、hCG による妊娠黄体から分泌される大量の P のために、いわば feed back 的に hCG 分泌が抑制されたのではないかとする推測もある。hCG の生理学的意義については、なお不明な点が多い。妊娠初期に hCG の作用により母体卵巣より大量の P を分泌させ、それが子宮内膜の脱落膜化を生じ胎芽の発育を安全にすることは疑義のないことであるが、一方、臨床面で、妊娠合併の両側卵巣腫瘍または、残存一側卵巣の腫瘍化で、妊娠 8 週以後に卵巣組織をすべて摘除しても、流産その他の障害はほとんど全く起らないとされている^{16,17)}。これは TB から分泌される P が作用を代行するためとされるが、妊娠ごく初期に、全卵巣組織を摘除しても流産が起らなかったとするものも少なくない。

そのような観点や、胎盤由来 P が大量に分泌される妊娠後半期にも大量の P が分泌されることから考える

と、hCG には母体卵巣黄体化以外に何らかの生理学的生物学的作用が存在するのではないかと思考される。これらの検索にも絨毛膜の組織培養による研究は、種々解明の端緒を与える可能性を有するものと思われる。

PN は P および DHA の precursor であり、妊娠中、血中 PN 濃度は、その経過と共に増加し、末期では約 $2.5 \mu\text{g}/\text{dl}$ となる³⁹⁾。また、P の血中濃度は、妊娠初、中、末期ではそれぞれ約 1, 5, $10 \mu\text{g}/\text{dl}$ である^{36,38)}。一方、胎盤から胎児へ帰る臍帯静血中 PN 濃度は、約 $7 \mu\text{g}/\text{dl}$ で³⁷⁾、P 濃度は $70 \sim 100 \mu\text{g}/\text{dl}$ である^{35,39)}。

BeWo 細胞の培養における PN 添加の影響については $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の終末濃度では培養第 3 日で hCG 分泌が停止したとするものがあるが³²⁾、この場合、ethanol 終末濃度は 1% であるので、その影響によるものともみなされる。ethanol 濃度 0.2% であった本実験では、PN 添加により細胞増殖は中等度に抑制されたが、細胞の hCG 分泌能は抑制されなかった。

臨床面で絨毛性腫瘍は、hCG 分泌は急増するが、P については不定である。細胞自身が分泌した P が、その細胞に影響を与えるか否かについては、理論的に種々の問題があり、P と悪性化した絨毛膜との関係とは異なるが、子宮内膜癌組織に対して、P が抑制作用を有していることは、臨床的にも実験的にも実証されている。BeWo 細胞に対しては、P も ED も共に、細胞増殖は抑制されたが、細胞 1 箇当りの hCG 分泌量は、P では添加濃度の増加と共に減少したが、ED では増加した。24 時間の培養液中の hCG 量を細胞数で除したものを直ちに細胞 1 箇当りの hCG 分泌量とするのは、24 時間内の細胞数が一定している場合は、一応、分泌量としても妥当であるが、24 時間の前と後とで細胞数の激変する場合は、種々困難な面が生じてくる。すなわち、24 時間の前ではある程度の数の細胞が存在し、それに応じた hCG を分泌しており、24 時間の後では極めて少数の細胞しか残存しないというような場合算出された細胞 1 箇当りの hCG 量は極めて大きくなる。これを細胞の hCG 分泌量増加というのはもちろん妥当ではない。本実験では、平均細胞数で除したから、それほど極端なくいちはいはいないものと思われるが、理論的には、細胞 1 箇当りの hCG 量を直ちに分泌量とすることはできない場合がある。

また、分泌量と産生量の語を厳密に区分せずに使用したが、厳密にはごく短時間の培養液中に含まれる hCG 量をその時の細胞数で除したものが分泌量であり、一方、細胞内に含まれる hCG 量も含めて測定した場合、これを産生量というべきであろう。

ED の場合、細胞の損傷、破壊、減少が、P に比し大きい傾向が認められたが、これはそれぞれの生物作用

に比して、ED の添加濃度が P のそれに比し相対的に大きいと、ED 自体の絨毛膜組織に対する障害作用によるものと考えられた。動物実験においても ED 投与は、胎児胎盤を障害する傾向が小さくない。

胎盤から分泌されるのが ET であることも重要な意味を有しているものとみなされる。胎盤の ET が、卵巣における steroidogenesis と異なり、P から ED を経てではなく、DHA から ED を介さずにいわば直接的に ET となることから、ED の絨毛膜組織に対する障害性が推定されるように思われる。胎児胎盤系では、DHA-S の大部分が、 $16 \alpha\text{-OH-DHA-S}$ を経て ET となる。また、妊婦尿中に排泄される ET の 90% は胎盤由来のものであり、他は母体由来のものである。また、妊婦副腎に由来する DHA-S の量は、胎児副腎のそれに比し少量で、妊婦血中 DHA-S 量は約 $40 \sim 20 \mu\text{g}/\text{dl}$ で妊娠経過と共に減少する。一方、胎児では臍帯動脈および静脈血中では、それぞれ約 70 および $40 \mu\text{g}/\text{dl}$ である³⁷⁾。

妊婦血中 DHA-S の 1/3 は ED となり、また、母体より胎児へは DHA-S はほとんど全く移行しない^{40,41)}。母体血中 ED 濃度は妊娠と共に漸次増加し、末期では約 $9 \sim 20 \text{ ng}/\text{ml}$ となる^{38,42-44)}。

DHA-S 添加により、BeWo 細胞の増殖にも、hCG 産生にも無影響であったことは、このような結合型のものは一般に生物作用を有していないという原則に一致するものと考えられる。DHA、T 添加では軽度の細胞増殖抑制がみられた。hCG 産生能には影響は認められなかったが、androgen の大量は BeWo 細胞や絨毛膜組織に抑制的障害的に作用するのではないかと推測された。DHA、T は DHA-S に比し、妊婦血中濃度は微量であり、DHA は約 $0.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ 、T は約 $0.2 \mu\text{g}/\text{dl}$ で、T は妊娠経過と共に増量する³⁷⁾。DHA は分娩時約 $3 \mu\text{g}/\text{dl}$ で、また、分娩直後の臍帯動脈血中 DHA 濃度は約 9 および $6 \mu\text{g}/\text{dl}$ である⁴⁰⁾。これら androgen が、妊婦、胎児胎盤にどのような影響を及ぼしているかについては、多くの面でなお不明の点が多い。

MTX は主要作用点が dihydrofolate reductase である葉酸拮抗物質であり、臨床的にも絨毛性腫瘍に対して有効である。BeWo 細胞に対する作用としては、MTX を $0.1 \sim 1000 \mu\text{M}$ を添加して培養した場合、細胞数に著明な変化が認められなかったとするものもあるが⁴⁵⁾、本実験では、相当の増殖抑制作用が認められた。しかし、DRC に比し、細胞破壊作用が軽度である傾向がみられたが、その差は作用機構の差にも由来するものと思われる。

DRC は streptomyces var. caesioides から得られた抗腫瘍性抗生物質であり、その作用機構は DNA に強く

結合して DNA-RNA 合成を阻害する。しかし、蛋白合成にはほとんど影響しないとされる。DRC 添加の本実験では、hCG 産生量の著増が認められたが、これは細胞障害のためともみなされるが、また、何らかの機構で細胞自体の hCG 分泌能が高まったのではないかと考えられる。BeWo 細胞の hCG 産生について、Actinomycin D を添加した場合、hCG 分泌は数倍に、細胞内 hCG 濃度は十数倍になったとの報告もある⁴⁶⁾。これらからも、細胞障害と hCG との関連性、各種添加物質による hCG 分泌促進作用などの問題は、絨毛膜組織の組織培養における重要な問題の一つである。

結 論

ヒト妊娠性絨毛上皮腫に由来する BeWo 栄養膜細胞系 BeWo trophoblastic cell line (BeWo 細胞系) を被検材料として、この細胞増殖状態および hCG 産生量に及ぼす pregnenolone (PN), progesterone (P), estradiol (ED), dehydroepiandrosterone (DHA), DHA sulfate (DHA-S), testosterone (T), hCG, methotrexate (MTX), doxorubicin (DRC) 添加の影響について検索し、次の結果を得た。

steroid hormone は ethanol に溶解して、培養液に添加されたが、ethanol 終末濃度が 0.25% 以下であれば、細胞増殖速度や形態面では対照群と ethanol 添加群の間にほとんど全く差が認められなかった。本実験では ethanol 終末濃度が 0.2% となるようにして添加実験を行なった。

添加 steroid hormone 終末濃度は 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、一般に steroid hormone 添加により、細胞増殖は軽度あるいは著明に抑制され、その程度は添加濃度の増加に伴って増強した。その抑制の強さは、ED および P が最も強く、また ED が P より強い抑制を示す傾向が認められた。ED 添加の場合は、第 7 日における対照群の細胞増加比は平均 21.6 倍であったが、ED 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加では平均 11.0, 0.87 倍と低下し、10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加では第 3 日ですでに平均 0.16, 0.07 倍と激減した。P 添加の場合は、第 7 日における対照群の細胞増加比は平均 24.0 倍であったが、P 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加では平均 7.3, 1.3 倍と低下し、10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加では第 3 日で平均 0.55, 0.23 倍と減少した。

細胞 1 個当たり 24 時間の hCG 産生分泌量は、ED 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の添加濃度では、ED 濃度の増加と共に著しく増加したが、一方、P 添加の場合では、濃度の増加と共に減少する傾向が認められた。

PN 添加の場合の細胞増殖抑制の程度は中等度であり、DHA, T 添加ではその抑制は軽度であった。また、DHA-S, hCG にはほとんど全く抑制作用は認められ

ず、対照群との間に著変は認められなかった。細胞 1 個当たりの hCG 産生量に及ぼす影響では、PN, DHA, DHA-S, T の添加濃度が変化しても、細胞の hCG 産生量はほぼ一定値を保った。

MTX, DRC の添加濃度は 1, 5, 10, 50 ng/ml であったが、BeWo 細胞増殖に及ぼす影響では、1 ng/ml では共にさほどの効果はなく、5 ng/ml では、MTX の場合は細胞数の増加が停止し、DRC の場合は急激な減少を示した。その細胞破壊作用は濃度の増加と共に増大した。細胞 1 個当たりの hCG 産生量は、DRC の場合には濃度の増加に伴って著明に増加したが、MTX の場合には濃度の増加と共に中等度に増加した。

終りに指導と校閲をいただいた西田悦郎教授に深甚の謝意を表します。また、種々の面で教示、協力いただいた井本、寺田博士始め各教官、穴田、相川、中川、山崎、荒木各技術員に感謝し、併せて技術面で指導を賜った本学がん研究所分子免疫部右田教授に感謝致します。

文 献

- 1) Simpson, E. R. & MacDonald, P. C.: Endocrine physiology of the placenta. *Ann. Rev. Physiol.* 43, 163 - 188 (1981).
- 2) Everett, R. B. & MacDonald, P. C.: Endocrinology of the placenta. *Ann. Rev. Med.*, 30, 473 - 488 (1979).
- 3) Sucheston, M. E. & Cannon, M. S.: Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J. Morph.*, 126, 477 - 492 (1968).
- 4) Frandson, V. A. & Stakemann, G.: The site of production of estrogenic hormones in human pregnancy. *Acta Endocr.*, 47, 265 - 276 (1964).
- 5) Harkness, R. A., Menini, E., Charless, P., Kenny, F. M. & Rombautl, R.: Studies of urinary steroid excretion by an adrenalectomized woman during and after pregnancy. *Acta Endocr.*, 52, 409 - 415 (1966).
- 6) Bolté, E., Mancuso, S., Eriksson, G., Wiquist, N. & Diczfalusy, E.: Studies on the aromatization of neutral steroids in pregnant women. *Acta Endocr.*, 45, 576 - 599 (1964).
- 7) Simmer, H. H., Eastering, W. E. Jr., Pion, R. J. & Dignam, W. J.: Neutral C_{19} steroid sulfates in human pregnancy. *Steroids*, 4, 125 - 135 (1964).
- 8) Bolté, E., Mancuso, S., Eriksson, G., Wiquist, N. & Diczfalusy, E.: Studies on the

- aromatization of neutral steroids in pregnant women. *Acta Endocr.*, **45**, 535 - 559 (1964).
- 9) Bolté, E., Mancuso, S., Eriksson, G., Wiqvist, N. & Diczfalusy, E.: Studies on the aromatization of neutral steroids in pregnant women. *Acta Endocr.*, **45**, 560 - 575 (1964).
- 10) Charreau, E., Jung, W., Loring, J. & Villet, C. A.: Biosynthesis of estrogens by perfused full-term placentas. *Steroids*, **12**, 29 - 40 (1968).
- 11) Kirchner, M. A., Wiqvist, N. & Diczfalusy, E.: Studies on oestradiol synthesis from dehydroepiandrosterone sulfate in human pregnancy. *Acta Endocr.*, **53**, 584 - 597 (1966).
- 12) Lamb, E., Mancuso, S., Dell'Acqua, S., Wiqvist, N. & Diczfalusy, E.: Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human fetoplacental unit. *Acta Endocr.*, **55**, 263 - 277 (1967).
- 13) Pecile, A. & Finzi, C. ed.: The fetoplacental unit. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.*, **183**, 3 - 215 (1968).
- 14) Pattillo, R. A., Gey, G. O., Delfs, E., Huang, W. Y., Hussa, L., Garancis, J., Knoth, M., Amatrudda, J., Bertino, J., Friesen, H. G. & Mattingly, R. F.: The hormone-synthesizing trophoblastic cell in vitro: a model for cancer research and placental hormone synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **172**, 288 - 298 (1971).
- 15) Midgley, A. R. Jr. & Pierce, G. B. Jr.: Immunohistochemical localization of human chorionic gonadotropin. *J. Exp. Med.*, **115**, 289 - 294 (1962).
- 16) Bradbury, J. T., Brown, W. E. & Gray, L. A.: Maintenance of the corpus luteum and physiologic actions of progesterone. *Recent. Prog. Horm. Res.*, **5**, 151 - 194 (1950).
- 17) Yoshimi, T., Strott, C. A., Marshall, J. R. & Lipsett, M. B.: Corpus luteum function in early pregnancy. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **29**, 225 - 230 (1969).
- 18) Thiede, H. A.: Studies of the human trophoblast in tissue culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **79**, 636 - 647 (1960).
- 19) Tao, T.-W.: Aggregation of dissociated human embryonic cells: interaction of trophoblast with autologous liver and lung. *Exp. Cell Res.*, **36**, 275 - 284 (1964).
- 20) Wingate, L. & Wingate, M. B.: Human trophoblast culture in an isolated xenogeneic intestinal system. *Int. J. Gyn. Obst.*, **10**, 125 - 130 (1972).
- 21) Hertz, R.: Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **102**, 77 - 81 (1959).
- 22) Pattillo, R. A. & Gey, G. O.: The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res.*, **28**, 1231 - 1236 (1968).
- 23) 沢井政信: ラテックス近赤外比濁法—原理とFDP, hCGの測定—免疫実験操作法VIII, 2393 - 2400頁 (1979).
- 24) 沢井政信, 須藤志満, 奥村一, 森田司郎, 佐藤茂, 松本紳一郎, 右田俊介: ラテックス凝集反応の近赤外比濁法によるイムノアッセイ. 臨床化学シンポジウム, 第18集, 22~26頁 (1978).
- 25) Midgley, A. R., Pierce, G. B., Deneau, G. A. & Gosling, J. R. G.: Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vitro: an autoradiographic demonstration. *Science*, **141**, 349 - 350 (1968).
- 26) Tao, T.-W. & Hertig, A. T.: Viability and differentiation of human trophoblast in organ culture. *Amer. J. Anat.*, **116**, 315 - 328 (1965).
- 27) Wynn, R. M.: Cytotrophoblastic specializations: an ultrastructural study of the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **114**, 339 - 355 (1972).
- 28) Thiede, H. A. & Choate, J. W.: Chorionic gonadotropin localization in the human placenta by immunofluorescent staining. *Obstet. Gynecol.*, **22**, 433 - 443 (1963).
- 29) Pattillo, R. A., Hussa, R. O., Huang, W. Y., Delfs, E. & Mattingly, R. F.: Estrogen production by trophoblastic tumors in tissue culture. *J. Clin. Endocr.*, **34**, 59 - 61 (1972).
- 30) Kohler, P. O. & Bridson, W. E.: Isolation of hormone producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocr.*, **32**, 683 - 687 (1971).
- 31) Rabson, A. S., Rosen, S. W., Tashjian, A. H. Jr. & Weintraub, B. D.: Production of human chorionic gonadotropin in vitro by a cell line derived from a carcinoma of the lung. *J. Nat. Cancer Inst.*, **50**, 669 - 674 (1973).
- 32) Pattillo, R. A., Hussa, R. O., Delfs, E., Garancis, J., Bernstein, R., Ruckert, A. C. F., Huang, W. Y., Gey, G. O. & Mattingly, R. F.:

- Control mechanism for gonadotrophic hormone production in vitro. *In Vitro*, 6, 205 - 214 (1970).
- 33) Vaitukaitis, J. L.: Human chorionic gonadotropin, p63 - 75. *In* F. Fuchs, & A. Klopfer, (ed.), *Endocrinology of Pregnancy*, 2nd ed. Harper & Row Publishers Inc., New York, 1977.
- 34) Chough, S. Y.: Study on the systematic use of serial estimation of human placental lactogen (hPL) and human chorionic gonadotropin (hCG) for the management of trophoblastic neoplasia. *Endocrinol. Jap.*, 20, 9 - 21 (1973).
- 35) Braunstein, G.D., Rasor, J., Adler, D., Danzer, H. & Wade, M. E.: Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 126, 678 - 681 (1976).
- 36) Solomon, S. & Fuchs, F.: Progesterone and related neutral steroids, p 66 - 100. *In* F. Fuchs, & A. Klopfer, (ed.), *Endocrinology of Pregnancy*. Harper & Row Publishers Inc., New York, 1971.
- 37) Gandy, H. M.: Androgens. p123 - 156. *In* F. Fuchs & A. Klopfer (ed.), *Endocrinology of pregnancy*. 2nd ed. Harper & Row Publishers Inc., New York, 1977.
- 38) Tulchinsky, D., Hobel, C. J., Yeager, E. & Marshall, J. R.: Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 112, 1095 - 1100 (1972).
- 39) Harbert, G. M. Jr., McGaughey, H. S. Jr., Scoggin, W. A. & Thornton, W. N. Jr.: Concentration of progesterone in newborn and maternal circulations at delivery. *Obstet. Gynecol.*, 23, 413 - 426 (1964).
- 40) Guez, G., Gander, R., Schuy, E., Knapstein, P. & Oertel, G.: Free and sulfoconjugated dehydroepiandrosterone, cyclic adenosine -3', 5'-monophosphate and free estriol in maternal and cord blood. *Experientia*, 32, 117 - 118 (1976).
- 41) Madden, J. D., Siiteri, P. K., MacDonald, P. C. & Gant, N. F.: The pattern and rates of metabolism of maternal plasma dehydroisoandrosterone sulfate in human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 125, 915 - 920 (1976).
- 42) Abraham, G. E., Odell, W. D., Swerdloff, R. S., Hopper, K.: Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17 hydroxyprogesterone, and estradiol 17 β . *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34, 312 - 318 (1972).
- 43) Turnbull, A. C., Patten, P. T., Flint, A. P. F., Keirse, M. J. N. C., Jeremy, J. Y. & Anderson, Anne B. M.: Significant fall in progesterone and rise in estradiol levels in human peripheral plasma before onset of labor. *Lancet*, 1, 101 - 106 (1974).
- 44) Buster, J. E. & Abraham, G. E.: The applications of steroid hormone radioimmunoassays to clinical obstetrics. *Obstet. Gynecol.*, 46, 489 - 499 (1975).
- 45) Hussa, R. O. & Pattillo, R. A.: Effects of methotrexate on established cell lines of human choriocarcinoma. *Eur. J. Cancer*, 8, 523 - 529 (1972).
- 46) Hussa, R. O., Pattillo, R. A., Delfs, E. & Mattingly, R. F.: Actinomycin D stimulation of HCG production by human choriocarcinoma. *Obstet. Gynecol.*, 42, 651 - 657 (1973).

Effects of Steroid Hormones and Antineoplastics on Gonadotropin Production by Trophoblastic Tumor in Tissue Culture Tadashi Kubo, Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. E. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., **91**, 655-670 (1982)

Abstract

A study was made of the effects of addition of steroid hormones and antineoplastics on the cellular growth and the human chorionic gonadotropin (hCG) production in a human trophoblastic cell line (BeWo line) in tissue culture. Hormones and antineoplastics used in this study were pregnenolone (PN), dehydroepiandrosterone (DHA) and its sulfate (DHA-S), testosterone (T), progesterone (P), estradiol (ED), hCG, methotrexate (MTX), and doxorubicin (DRC).

The steroids were dissolved in ethanol and added to the culture medium. The final concentration of ethanol was 0.2% in the medium. It was previously confirmed that ethanol had no effects on the cellular growth under those conditions. The control medium was the mixture containing 50% Waymouth's MB 752/1, 40% Gey's balanced salt solution and 10% fetal bovine serum.

The hCG concentrations in the medium incubated for 24 hr were measured by means of a new method, latex photometric immunoassay (LPIA). This method is an immunoassay by near infrared turbidimetry of latex agglutination reaction.

The cellular growth of BeWo cell line was inhibited by addition of steroids. The degree of inhibitory effect at the concentration of steroids ranging 2.5-20 $\mu\text{g/ml}$ was as follows: ED>P>PN>DHA>T>DHA-S. DHA-S had approximately no inhibitory effects. P or ED at final concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ stopped the increase of cell population. Cell populations on the 7th day of incubation with steroids were approximately equal to those on the starting day, while those increased by 20 to 30 times after 7 days of incubation in the control medium without steroids.

The amount of hCG per 24 hr per cell in the medium decreased according to the increase of concentration of P, on the other hand, that was remarkably increased in the case of ED. DHA, DHA-S, and T had approximately no effect on hCG production rate. The addition of hCG caused no inhibition of the cellular growth.

MTX and DRC inhibited the cellular growth intensively. More intensive inhibition of the cellular growth was observed by addition of DRC than by that of MTX at the same concentration. The amount of hCG per 24 hr per cell in the medium increased remarkably in the case of DRC. Relations between the malignancy of trophoblastic cells and the effects of steroids, and action of steroids on the hCG production were discussed.