

初代培養牛乳腺細胞における凍結保存法の検討

古村 圭子

畜産管理学科家畜生産管理学講座

1. 目 的

産業家畜である牛を用いて実験を行うことは、実験動物を用いる場合に比べ、様々な制約があったり供試出来ない。乳産生の仕組みは種による違いがあり、牛における乳産生の機構を解明するためには、牛自身の乳腺を用いて研究する必要がある。また多くの牛を必要とする in vivo (生体) 系の実験ではなく、少ない牛で行える in vitro (体外) 系の実験の方が実際的に有益である。

牛1頭の乳腺組織からは、実験動物のマウスやラットの1匹の乳腺組織に比べ、数十倍以上の乳腺細胞が得られる。この細胞を用いて初代培養を行うことは、長期間培養を続けて維持されている継代細胞に比べて、細胞の性質が変化(脱分化)していないため、生体の生理条件により近い条件で実験を行うことになる。つまり初代培養細胞は、適切な培養条件下では細胞増殖のみならず乳汁合成をさせることが可能である。そこで牛1頭供試時に大量に得られる初代培養細胞を無駄なく利用し、必要なときに解凍して細胞をすぐ使用できる牛乳腺細胞の凍結保存法の検討を行うことを目的とした。

2. 方 法

①供試動物

ホルスタイン種搾乳牛	12頭
ホルスタイン種未経産牛(5, 6, 12カ月齢)	3頭
ホルスタイン種去勢雄牛(23カ月齢)	3頭

②乳腺処理

1. 乳腺採取

十勝畜産公社：屠殺後約20分以内に搾乳牛の乳房から1乳区を採取した。

帯広畜産大学：屠殺後約5分以内に未経産牛及び去勢雄牛の乳房を採取した。

採取後アイスボックス中に氷冷して研究室に運んだ。

2. 表面を消毒した乳房より乳腺ブロック(約50g)を切りとった。そのブロックを抗生物質入り培地で5回洗浄後、ブロックを細切して、再度洗浄してからミンチを行った。

3. ミンチした乳腺組織に消化酵素*を加え、恒温振盪槽で4 (37°C) ないし 21 時間 (37 → 25°C) の消化を行った。

*Collagenase (1 mg/ml, CLS II, 126 U/mg)
Hyaluronidase (1 mg/ml, Type I-S, 295 NFG/mg)

4. 消化後、段階的に 40-mesh wire filter 及び 200 μ m nylon mesh, 100 μ m nylon mesh の 3 種類のメッシュを通して細胞塊を得た。

5. 細胞塊を遠心分離 (640 x G, 5 min) により集め、細胞数及び生存率を測定した。

6. マルチウェルプレート (24 穴) をコラーゲン溶液 0.3 ml でコート後、コラーゲン-細胞塊混合溶液 0.5 ml を重層し、培養液 0.5 ml を加えて 37°C, 5% CO₂:95%O₂ で培養を行った。

③ In vitro 処理

A: 基礎培養液

BSA	25	%
Transferrin (Tf)	5	μ g/ml
Reduced glutathione	1	μ g/ml
Trypsin inhibitor	100	U/ml
HEPES	25	mM
Sodium acetate	10	mM
Sodium bicarbonate	26.2	mM

B: A+FCS (10%)

C: A+Mammogenic hormone

Bovine Insulin	1	μ g/ml
Hydrocortisone	0.5	μ g/ml
Bovine prolactin	1	μ g/ml
Estradiol-17 β	1	μ g/ml
Progesterone	0.1	μ g/ml

D: C+EGF (0.1 μ g/ml)

④ 培養条件

動物	In vitro 処理	サンプリング
搾乳牛 (LAC)	A, B, C, D	培養 5 日
未経産牛 (NUL)	B, C,	培養 5 日
去勢雄牛 (CAS)	A, B, C, D	培養 5 日

培養 2 及び 4 日に培養液の交換を行い、4 日目には³H-Thymidine (³H-TdR) を添加し、24 時間標識した。その後ゲルごと細胞塊を回収し、細胞中に取り込まれた³H 量及び細胞核の DNA 量を測定して細胞増殖性を調べた。また一部の細胞塊標本は組織学的研究に用いた。

⑤凍結法

酵素処理後、細胞数を測定した細胞塊は凍結溶液に再浮遊させた。

凍結溶液A：80% M 199, 10% DMSO, 10% FCS

凍結溶液B：90% M 199, 10% DMSO, 0.1% Methylcellulose

再浮遊させた細胞塊を1.8 mlの凍結チューブに1.0 mlずつ分注し、発泡スチロール内に上下逆さに立て、 -80°C の冷凍庫で一晩かかって緩慢に凍結させた。凍結したチューブはラックに移して保存した。2カ月保存後、 37°C の恒温振盪槽で急速解凍を行い、凍結溶液を除去して培養液に再浮遊後、細胞塊の生存率を調べた。

3. 結 果

① Collagenase 及び Hyaluronidase による乳腺の消化処理に対して、搾乳牛の乳腺は非常に脆く、消化時間が長くなるにつれて (21 時間) 細胞の死滅する割合が高くなり (生存率 60%)、デブリの大量の発生を見た。そのため細胞増殖性を示す $100\ \mu\text{m}$ のメッシュ上に残る細胞塊は少なく、細胞増殖性の低いメッシュを通過する単離細胞数が多くなった。

② ^3H -TdR 取り込み量

搾乳牛は *in vitro* 処理に対してほとんど反応を示さず、 $100\ \mu\text{m}$ のメッシュ上に残った細胞塊とメッシュを通過した単離細胞数とに違いはみられなかった (Fig. 1)。一方、去勢牛及び未経産牛の乳腺細胞は *in vitro* 処理に対して搾乳牛の 10 倍~200 倍の取り込みを示し、無血清ホルモン添加区 (C, D) は 10% 血清添加区 (B) とほぼ同じ取り込み量を示した (Fig. 2 および 3)。さらに未経産牛の乳腺では $100\ \mu\text{m}$ のメッシュ上に残った細胞塊はメッシュを通過した単離細胞数の 15 から 50 倍高い取り込み量を示した。また培養開始日に対する培養終了時の DNA 量の増加率も細胞塊の方が単離細胞よりも高い値であった (Fig. 4)。

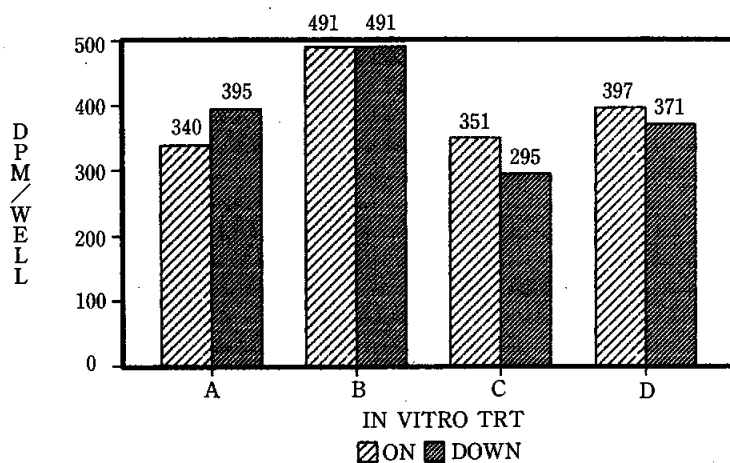


Fig. 1 Effect of *in vitro* treatment and type of mammary cells obtained from lactating Holstein cows on ^3H -thymidine incorporation (DPM/WELL).
On : Mammary organoids trapped on $100\ \mu\text{m}$ mesh.
Down : Mammary cells passed through $100\ \mu\text{m}$ mesh.

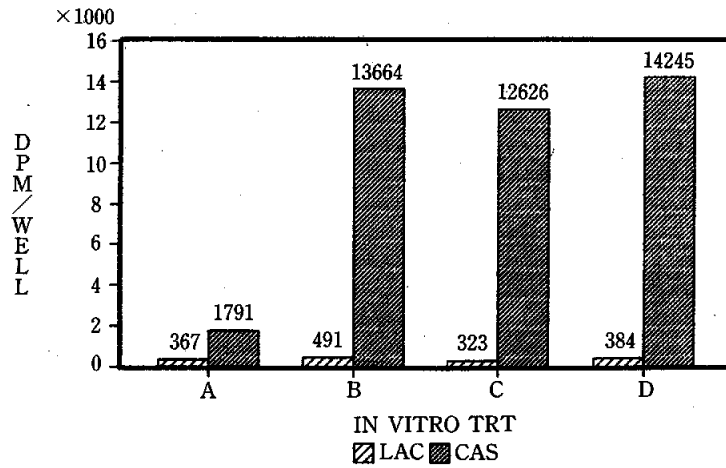


Fig. 2 Effect of *in vitro* treatment and physiological condition on ^3H -thymidine (DPM/WELL) incorporation in mammary organoids obtained from lactating Holstein cows and castrated Holstein steers.
 LAC : Mammary organoids from lactating Holstein cows.
 CAS : Mammary organoids obtained from Holstein steers.

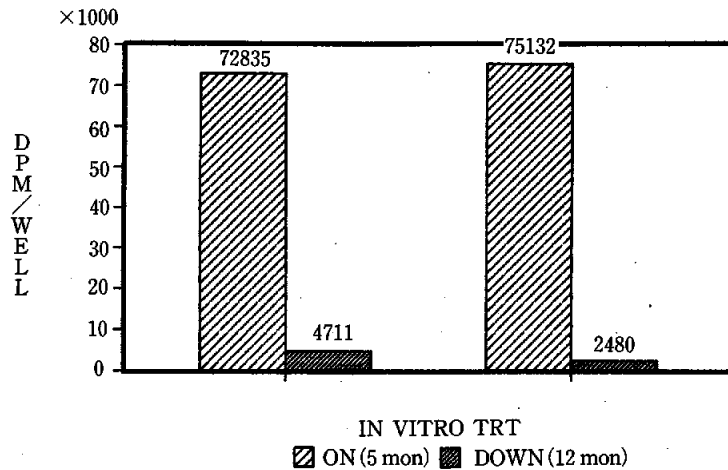


Fig. 3 Effect of *in vitro* treatment and type of mammary cells obtained from nulliparous Holstein heifers on ^3H -thymidine incorporation (DPM/WELL).
 On : Mammary organoids trapped on $100\ \mu\text{m}$ mesh.
 Down : Mammary cells passed through $100\ \mu\text{m}$ mesh.

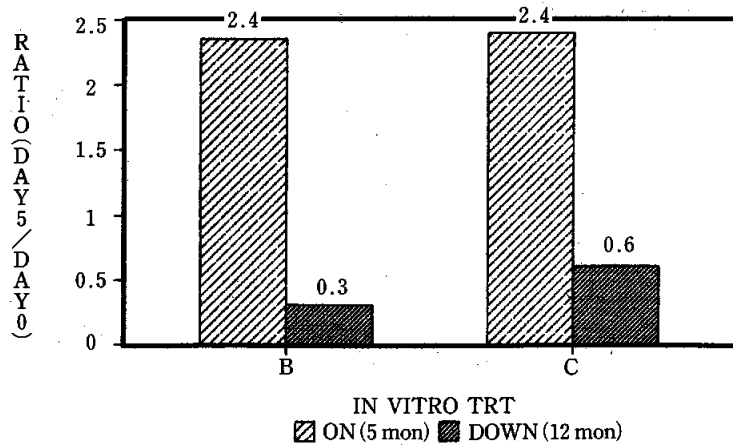


Fig. 4 Effect of *in vitro* treatment and type of mammary cells obtained from nulliparous Holstein heifers on DNA ratio (DNA of day 5/DNA of day 0):

On : Mammary organoids trapped on 100 μ m mesh.
Down : Mammary cells passed through 100 μ m mesh.

③ コラーゲン・ゲル内包埋培養での細胞塊の形態変化

去勢牛及び未経産牛の乳腺細胞塊は培養日数にとまらぬ、細胞塊より樹状突起様の増殖を示して形態的变化を遂げたが、搾乳牛の乳腺細胞は培養5日間の間に形態的变化を示さなかった。

④ 凍結保存後の生存率

搾乳牛は酵素処理後の凍結前の新鮮細胞でも生存率は60%であり、凍結後融解した細胞では凍結溶液の種類によらず50%以下の生存率であった。

4. 考 察

乳腺組織は乳腺上皮細胞のみならず結合組織、脂肪組織、血管や神経といったさまざまな組織が複雑に絡み合っている。そのために乳腺組織から乳腺上皮細胞塊を得るために酵素処理やメッシュといったふるい分けが工夫される。乳房の発達度合から大量の上皮細胞塊が得られると思われた搾乳牛の乳腺組織を用いて、酵素処理時間を変えて今回実験を行ったが、搾乳牛の乳腺細胞は昨年度行った妊娠牛や今回行った未経産牛、去勢雄牛の乳腺細胞に比べて死滅し易い傾向にあった。酵素処理時間とともに回収できる細胞数は増加したが、デブリの発生を抑制するためのDNase添加後、恒温振盪槽の温度を室温まで低下させて処理を継続しても経過時間とともにデブリつまり死滅細胞数の急激な増加が見られた。そのため酵素処理終了後の新鮮細胞塊でも生存率は低く(60%)、そのままコラーゲン・ゲル内包埋培養を行っても形態的变化および細胞増殖は観察されなかった。

搾乳牛の乳腺細胞が増殖性を示さないことが Baumrucker et al. (1988)²⁾によっても報告されている。彼らは走査電顕による観察で、乳腺上皮細胞塊または乳腺小様が培養開始後急速にコラーゲングルと接着するが、6日間の培養中形態的变化をまったく示さなかったことを見いだしている。

しかし Talhouk et al. (1990)³⁾は凍結保存後の搾乳牛乳腺細胞が増殖し、乳中に特有なタンパク質である α -s1 casein を分泌する事を報告している。細胞増殖を示す彼らの位相差顕微鏡写真からは乳腺実質細胞よりむしろ繊維芽細胞様の細胞増殖が活発であることが観察される。

去勢雄牛では乳房はまったく発達してはず、乳頭及び第1ないし第2次乳管が観察されるのみである。しかし酵素処理後の生存率は高く80%を越え、新鮮細胞塊の培養では搾乳牛の10倍以上の高い増殖性を示した。ただ回収できる細胞数が極端に少ないため凍結保存用の細胞塊を得ることが不可能であった。同様に未経産牛においても細胞増殖性の低い単離細胞数より高い増殖性を示す細胞塊の方が多く回収出来たが、凍結保存用の細胞塊を得るためには単位重量あたりの収量が低いことにより多くの乳腺組織を必要とした。未経産牛の月齢にもよるが、5~6カ月齢では乳房における脂肪組織の割合が乳腺実質の割合より高いため実験に十分量の乳腺上皮細胞塊を回収するには複数頭の牛が必要であった。

以上から、コラーゲン・ゲル内包埋培養において乳腺細胞の増殖性について研究を行うためには搾乳牛乳腺細胞より未経産牛や去勢雄牛さらに妊娠牛の乳腺細胞を用いて行う方がよいことが示唆された。

5. 文 献

- 1) Shamay, A., N. Cohen, M. Niwa and A. Gertler, (1988). *Endocrinology*, 123: 804.
- 2) Baumrucker, C. R., K. P. Deemer, R. Walsh, T. L. Riss and R. M. Akers, (1988). *Tissue Cell*, 20: 541.
- 3) Talhouk, R. S., R. L. Neiswander and F. L. Schanbacher, (1990). *Tissue Cell*, 22: 583.