

助成番号：210

ウシ黄体細胞の内分泌機能に関する免疫組織化学的研究

奥 田 潔

獣医学科家畜臨床繁殖学研究室

1. 目 的

黄体細胞の progesterone の産生分泌に関しては、現在まで種々の組織化学、また血液中、あるいは黄体組織中 progesterone 値の測定などの間接的な検索により、その機能を推測するにとどまっている。

本実験では、ウシ黄体に関して、P 産生細胞をより直接的に証明するために、anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum (anti-p) を用いて、免疫組織化学を試みた。

2. 方 法

屠畜場においてホルスタイン種乳牛より、子宮に肉眼的異常、あるいは胎芽、胎仔の存在が認められない個体の卵巣から、開花期黄体 ($n=20$) を採取し、ただちに 5mm 四方角に細切して浸漬固定した。固定の検討として、4%paraformaldehyde, 2%glutaraldehyde, プアン液, 中性ホルマリン液を用いたが、4%paraformaldehyde が最も良い成績であったので、以後の検索は、4%paraformaldehyde で行った。固定は、室温で 6~7 時間行い、続いて PBS (phosphate buffered saline, 0.01M, pH7.2) で十分に洗浄の後、30% sucrose 中に約 12 時間浸漬した。次に液体窒素で凍結し、5~10 μ のクリオスタット切片とした。作成した切片は、ゼラチン処理したスライドガラスに貼布し、約 1 分間室温放置の後、免疫組織化学的染色手技に移るまで PBS 内に入れた。

一次抗体に用いた抗体 (anti-p) は、11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate- bovine serum albumin を雄ウサギに免疫して作成されたものである。

酵素抗体法に用いた avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法は、Vector 社 Vecstain ABC キット (California) を用いて次の示す通り行った。

手順

- (1) 切片を非特異的反応の防止の為に、正常ヤギ血清で 1 時間反応
- (2) PBS で洗浄
- (3) anti-p を 12~18 時間反応
- (4) PBS で洗浄
- (5) ビオチン化 2 次抗体を 30 分反応
- (6) PBS で洗浄
- (7) アビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体を反応
- (8) PBS で洗浄
- (9) 0.02% 過酸化水素水と 0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン塩酸塩 (同仁化学, 熊本) を含む溶液 (Trizma buffer, pH7.4) で 10~15 分発色。

これらは、室温湿器内で行われ、3 の反応は、4 $^{\circ}$ C 下で行われた。anti-p の適正希釈濃度を知るために、20 倍~5,000 倍まで、BSA1% を含む PBS で希釈し、試験した。

なお、免疫組織化学レベルでの特異性の検定のために、以下のものを 1 次抗体の代替に使用した。

A. 1,000 倍希釈 anti-p に次の物質を 200 μ g/ml 加え、4 $^{\circ}$ C, 24 時間、反応させたもの。

- (1) progesterone (Merk, Darmstadt)
- (2) pregnenolone (Sigma, Saint Louis)
- (3) 17 α -hydroxyprogesterone (Sigma)
- (4) progesterone で反応させたのちに pregnenolone に反応させたもの。
- (5) progesterone で反応させたのちに 17 α -hydroxyprogesterone に反応させたもの。
- (6) pregnenolone で反応させたのちに 17 α -hydroxyprogesterone に反応させたもの。

B. 1,000 倍希釈 anti-p に bovine serum albumin を 0.1g/ml 加え、4 $^{\circ}$ C, 24 時間 incubate したものの。

C. 500 倍希釈 normal rabbit serum

D. PBS

作成した標本を、通常的手段により脱水後、バルサムにて封入して鏡検観察した。

3. 結 果

anti-p の特異性の検定の結果、progesterone で 24 時間反応させたものでは、ほとんど染色性を失い、pregnenolone では、わずかに影響を受け、 17α -hydroxyprogesterone では、ほとんど影響を受けなかった (Table 1)。また progesterone で反応させたあと、pregnenolone で反応させたものでは、全く陽性反応を示さなかった (Table 1)。BSA を加え、24 時間 incubate したものは、全く影響を受けず、normal rabbit serum ならびに PBS では、全く陰性であった。

陽性反応は、anti-p の希釈倍率が 20 倍から 2,000 倍までに認められたが、観察するのに適当な濃度は、1,000 倍であり、以下の実験は、全て 1,000 倍に希釈した anti-p を用いて行われた。

Table 1. Absorbtion test with progesterone, pregnenolone and 17α -hydroxy-progesterone for the anti- 11α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum

	progesterone	pregnenolone	17α -hydroxy progesterone
progesterone	±	—	±
pregnenolone	—	+	+
17α -hydroxy- progesterone	±	+	++
* grade of immunoreactivity ;		— completely absorbed ± almost absorbed + slightly affected ++ not influenced	

一般所見：すべての黄体細胞が、anti-p に陽性反応を示した。陽性反応は、細胞質全体にわたって均一に見られたが、強拡大で観察すると微細顆粒内容を呈し、核はやや染まった。小型の黄体細胞は、大型黄体細胞の間に浸入しているように認められた。黄体細胞内に大小様々の脂肪滴が認められるものがあったが、脂肪滴の有無多少と、anti-p に対する陽性反応に相関性は認められなかった。大型の黄体細胞の形は不規則で、中には突起を出しているように見える細胞もあった。

4. 考 察

ステロイドホルモンの分子量は 500 以下と小さく、それ自体では抗原性を持たないが、ステロイドと蛋白との結合物に対しては、抗体が作られ、ステロイドそのものは、ハプテンとして働くことが明らかにされ、免疫化学の基礎研究に大きな発展をとげてきた。しかし、感度と精度を信頼するものにするためには、特異性の高い抗体を得る必要がある。一般に、ステロイドホルモンの抗体は、担体蛋白を結合する部位によって、その特異性が左右され、蛋白結合部から遠くにある側鎖ほど特異性が高く認識されることが明らかにされている。本検索で用いた anti-p は、 11α -hydroxyprogesterone の C-11 の部位の水酸基を succinate に変換し、蛋白と結合させたもので、proges-

terone に対する特異性が高いとされているものである。

本研究で用いた anti-p の特異性の検討で、progesterone でほぼ完全に吸収され、また pregnenolone では、わずかに影響を受け、また progesterone に 24 時間反応させたあと、pregesterone で反応させたものは、陽性反応を全く示さなかったことより、本試験で用いた anti-p は、ほとんどが progesterone 様免疫活性物質と反応しているが pregnenolone 様免疫活性物質ともわずかながら反応していることが示された。従って本法では、progestins 産生細胞を検出していると考えられる。

濃淡の差は認められたが、全ての黄体細胞で anti-p に対して陽性反応が認められたことは、大型の黄体細胞も小型の黄体細胞も progesterone 産生に関与しているという過去の報告を裏付ける結果と思われる。近年ステロイド産生の調節に、“hypothalamo-hypophysial-gonadal axis” (視床下部—下垂体—性腺軸)の他に性腺そのものの調節機構があることを推測されている。したがって、黄体細胞もいわゆる内分泌機能の他に、パラクライン (傍分泌) 機能を有していることが推測される。傍分泌に関与する細胞は、突起を出すことを特長と考えられており、本研究において、陽性細胞の中に突起を出しているように見える細胞は、傍分泌に関与している細胞であることが示唆された。

本試験によって、anti-p を用いて、ウシ黄体の progestins 産生細胞の検出が可能であることが示され、また黄体細胞の傍分泌への関与が示唆された。