

ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系構築とテストステロン産生に及ぼす 内分泌かく乱化学物質のリスク評価への応用

中島羊奈子^a、佐藤 剛^a、大野修司^a、中澤裕之^a、牧野恒久^b、中陳静男^a

^a星薬大・薬、^b東海大・医

我々は内分泌かく乱化学物質が精巣のアンドロゲン産生系へ及ぼす影響を検討する *in vitro* モデルとして、アンドロゲン産生細胞であるブタ精巣ライディッヒ細胞の初代培養系の構築を行い、テストステロン産生に影響を及ぼす各種内分泌かく乱化学物質の検討を試みた。ブタ精巣におけるステロイド産生はヒトと類似していることから、ブタ精巣ライディッヒ細胞を初代培養のための実験材料として使用した。

去勢 (生後 2 週齢) により得られるブタ精巣から、コラゲナーゼ処理および Percoll を用いた遠心分離によりライディッヒ細胞を単離した。得られたライディッヒ細胞を 96well プレートの 1well あたり 6×10^4 cells として、DMEM/F12 培地中、37°C、5% CO₂—95% air の条件下で培養した。ステロイド産生を誘導するために 8Br-cAMP または hCG をメディウムに添加し、一定時間後に培養上清中に分泌されるテストステロンを RIA で測定し、対照群と比較した。

同時に細胞毒性の指標として、培養上清中に逸脱する LDH 活性を測定した。単離したブタ精巣ライディッヒ細胞のテストステロン分泌は、対照群と比較して 8Br-cAMP 添加により顕著に増加した。さらに、hCG 添加によっても同様にテストステロン分泌の増加を認め、細胞膜表面の性腺刺激ホルモン受容体との反応性も維持されていることを確認した。現在、ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系のテストステロン産生能に及ぼす各種内分泌かく乱化学物質のリスク評価への応用を検討中である。

Preparation of Primary Cultured Pig Testicular Leydig Cells and Application to Risk Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals on Testosterone Production

Yonako Nakajima^a, Go Sato^a, Shuji Ohno^a, Hiroyuki Nakazawa^a, Tsunehisa Makino^b and Shizuo Nakajin^a

^a Faculty, of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, Tokyo 142-8501, ^b Tokai University, School of Medicine, Kanagawa, 259-1143, Japan

As a model of androgens production in testicular tissue, we newly created primary cultured pig testicular Leydig cells system to evaluate the effects of endocrine disrupting chemicals on testosterone production. The steroidogenesis in pigs shows good agreement with that in humans and that is why we used pig testes as a source of primary culture Leydig cells. Isolated Leydig cells were cultured in 96 well culture plate (6×10^4 cells/ well) under conditions of 5% CO₂-95% air at 37°C. Testosterone concentration in cultured medium under the stimulation of 8Br-cAMP or hCG was measured by the RIA for total testosterone. The testosterone secretion level of pig testicular Leydig cells was memorably elevated by hCG stimulation as well as by 8Br-cAMP when compared with control experiments. From these results, we confirmed the responsibility of gonadotropin receptor with hCG on a membrane of prepared Leydig cells. Now we are studying an application to risk assessment of endocrine disrupting chemicals on testosterone production in primary cultured pig testicular Leydig cells.