

113

論 文 内 容 要 旨

性周期ならびに妊娠初期における牛末梢血
中性ステロイドの動態に関する研究

Studies on the peripheral plasma sex steroids in a cow
during the estrous cycle and in early pregnancy

百 目 鬼 郁 男

論文内容要旨

百目鬼郁男

論文題目

性周期ならびに妊娠初期における牛末梢血中性ステロイドの動態に関する研究

内容要旨

牛の繁殖障害のなかでリピートブリーダーは卵巣疾患，子宮疾患とならぶ主要なものである。リピートブリーダーの不受胎の主な原因は胚の早期死滅であると考えられており，その誘因としては遺伝因子，生殖器の感染，炎症，ホルモンの分泌異常ならびに受精卵の細胞質的欠陥などが推測されているが，なかでもホルモンの分泌異常は最も重視されるべきものである。

従来，牛体液中の性ステロイドの測定には比較的感度の高い生物学的手法が応用されていた。しかるに，近年アイソトープおよび各種のクロマト技術が進歩するに至り，化学的測定法ならびに competitive radioassay 法などの近代的手法が生物学的手法に代って応用されるようになってきた。とりわけ radioimmunoassay 法は，感度，特異性がきわめて高く，かつ操作が簡便で，比較的短時間に大量の検体を処理し得る優れた方法である。しかし，牛の末梢血中性ステロイド濃度は他の哺乳動物のそれに比べて著しく低いために諸種の繁殖状態におけるこの動態を精細に検討した報告は数少ない。

本研究では牛における受精障害，あるいは胚の早期死滅と性ホルモンの分泌異常との関連性を究明する目的で，先ず牛の血中 estrogen および gestagen を測定するための化学的測定法ならびに radioimmunoassay 法について 測定条件を吟味して，手法を確立し，これらの方法ならびに従来の生物学的手法を併せ用いて，正常性周期および妊娠初期における牛末梢血中 estrogen および gestagen の動態を明らかにした。ついでリピートブリーダー牛を実験的に授精後 15～28 日

の間に屠殺解剖して、子宮における胚の存在、あるいはその發育状態ならびに生殖器の器質的異常、細菌感染などについて検索するとともに授精前から屠殺時までの末梢血中 estrogen および gestagen の動態を追求して、不受胎牛ならびに受胎牛の間にはこれら性ステロイドの分泌型に顕著な相違があることを明らかにした。

以下に得られた成績の概要を記す。

1. 性ステロイドの測定法

1) 化学的測定法

牛血中 estrogen の測定に、比色法の高い特異性と蛍光法の高い感度を取り入れた Ittrich 蛍光法を応用するために、その測定条件を吟味して、Xenon ランプを使用した日立分光蛍光光度計 MPF-2A および 203 型による Ittrich color の最大波長は estrone, estradiol および estriol とともに共通で、励起光 538 nm, 蛍光 552.5 nm であることを明らかにし、さらに実際の測定においては両波長の接近を避けるために 510~520 nm で励起して、蛍光を 552.5 nm 前後で読む方法を検討して検出感度 1 ng の微量測定法を確立した。

つぎに progesterone の化学的測定法として progesterone を 20β -hydroxy-steroid-dehydrogenase により 20β -hydroxy-progesterone に転換して測定する Heap の蛍光法において、抽出純化の過程にペーパークロマトグラフィーの代りに操作が簡便で能率的な薄層クロマトグラフィーを導入して、n-hexane : ethyl acetate = 5 : 2 で 2 回, benzene : ethyl acetate = 2 : 1 で 1 回展開して、好結果が得られることを明らかにした。さらに発色性は濃硫酸 : ethanol = 3 : 2, 10 分, 60°C で最も強く、かつ安定で日立分光蛍光光度計 MPF-2A および 203 型による本蛍光の最大波長は励起光 468 nm, 蛍光 525 nm であることを明らかにした。Heap の蛍光法を改良した本法の牛血中 progesterone の最少検出量は 2.5 ng で精度、特異性ともに満足し得るものである。

2) radioimmunoassay 法

牛血中 estrogen の radioimmunoassay に estrone-17-oxime-bovine serum albumin, estradiol-17 β -6-oxime-bovine serum albumin ならびに estriol-6-oxime-bovine serum albumin に対する家兎抗血清を使用して, 検出感度が estrone および estradiol では 10 pg, estriol では 20 pg である高感度の estrogen 測定法を確立した。

また牛血中 progesterone, 20 β -hydroxy-progesterone, 17 α -hydroxy-progesterone の radioimmunoassay にそれぞれ progesterone-3-oxime-bovine serum albumin, 20 β -hydroxy-progesterone-3-oxime-bovine serum albumin ならびに 17 α -hydroxy-progesterone-3-oxime-bovine serum albumin に対する家兎抗血清を使用して, 検出感度がそれぞれ 10~20 pg である高感度の gestagen 測定法を確立した。

さらに, progesterone の抽出過程で粗抽出物をクロマトにより精製した場合と, この操作を省いた場合のそれぞれの測定値はほぼ等しいことを明らかにして, radioimmunoassay 法による牛血中 progesterone の簡易測定法を確立した。

以上の結果から, 牛血中 estrogen ならびに gestagen の測定に radioimmunoassay 法を応用し得ること, また本法は感度, 精度, 特異性, 測定操作の迅速性においてきわめて優れていること, さらに progesterone についてはクロマトによる精製操作を省いた直接法を応用し得ることなどが明らかにされた。

2. 性周期における末梢血中性ステロイドの動態

正常性周期を示す牛 2 1 頭を用い, 頸静脈から経日的に採取した血液材料について estrogen および gestagen の濃度を生物学的測定法, 化学的測定法および radioimmunoassay 法で測定して, 性周期におけるこれら性ステロイドの消長を比較検討した結果, 生物学的測定法による測定値は他のふたつの測定法によるそれに比べて高い値を示すが, いずれの方法によっても性周期の各時期における末梢血中の estrogen および gestagen あるいは progesterone の測定値はほぼ同様の

傾向で増減することを認めた。

すなわち estrogen は発情期，排卵前に鋭いピークを示し最高値に達し，排卵後に低下した後，黄体期にはふたたび増加する傾向を示した。発情期，排卵後および黄体期における総 estrogen のピーク値は生物学的測定法ではそれぞれ $3.34 \sim 8.90 \mu\text{g}/\ell$ ， $0.21 \sim 0.84 \mu\text{g}/\ell$ および $3.34 \sim 8.90 \mu\text{g}/\ell$ ，化学的測定法では $13.7 \sim 99.8 \text{ng}/\ell$ ， $3.8 \sim 5.3 \text{ng}/\ell$ および $10.1 \sim 27.0 \text{ng}/\ell$ ，radioimmunoassay 法では $10.6 \sim 20.0 \text{pg}/\text{ml}$ ， $5.4 \sim 11.0 \text{pg}/\text{ml}$ および $2.4 \sim 11.8 \text{ng}/\text{ml}$ であった。

gestagen は全般に黄体期に最高値，発情期に最低値を示したが，生物学的測定法では排卵前に一過性にわずかに増加することを認めた。黄体期における gestagen あるいは progesterone のピーク値および発情期におけるそれらの濃度水準は生物学的測定法では $8.00 \sim 10.67 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $2.67 \sim 5.33 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，化学的測定法では $2.6 \sim 6.2 \text{ng}/\text{ml}$ および $0.2 \sim 0.8 \text{ng}/\text{ml}$ ，radioimmunoassay 法では $1.8 \sim 5.8 \text{ng}/\text{ml}$ および $0.2 \sim 0.3 \text{ng}/\text{ml}$ であった。

しかし各個体間におけるこれら性ステロイドの濃度水準およびピーク形成の時期にはかなり大きい差異があることが注目された。

発情開始から排卵までの間の末梢血中 progesterone， 20β -hydroxy-progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone の動態を1頭の牛について2時間々隔で採取した血液材料を用いて詳細に検討したところ，progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone の測定値が排卵前に一過性に上昇する傾向が認められ，排卵にこれらの gestagen が一役を演じている可能性が示唆された。

3. 妊娠初期における末梢血中性ステロイドの動態

正常妊娠牛5頭について発情前期から授精後31～32日までの間に頸静脈から採取した血液材料について，妊娠初期における estrogen および gestagen の濃度を radioimmunoassay 法により測定した結果，estrogen は全般に低値 ($2.3 \sim 6.0 \text{pg}/\text{ml}$) で経過し，やや高い場合があっても，その期間はきわめて短く一過性であること，また progesterone のピーク値は $6.0 \pm 1.7 \text{ng}/\text{ml}$ で性周期における

黄体期のそれに比べて増加速度が早く、かつ濃度水準が高い傾向があることを認めた。さらに 20 β -hydroxy-progesterone は progesterone とほぼ同様に消長するが、17 α -hydroxy-progesterone は排卵後 12 日までは progesterone とほぼ同様に消長し、その後は急減して比較的低値で経過することを認めた。

4. リピートブリーダーにおける末梢血中性ステロイドの動態

農家から導入したリピートブリーダー 9 頭に授精を行ない、授精前後から授精後 15～28 日までの間に頸静脈から採取した血液材料について estrogen および gestagen の濃度を生物学的測定法によって測定し、発情前期から妊娠初期にかけてのこれら性ステロイドの消長を正常妊娠牛におけるそれと比較したところ、リピートブリーダーの発情期における estrogen 値は、最高値に達する時期および低下を開始する時期が正常妊娠牛のそれにくらべて 1～2 日遅延する傾向があることを認めた。

さらに正常妊娠牛における妊娠初期の gestagen 値は 黄体の発育に伴って増加し、estrogen は低値のまま経過するが、リピートブリーダーにおいて妊娠初期に胚死亡が認められた例では gestagen 値がきわめて低く、estrogen が高値を示したことが注目された。

以上の結果から、estrogen および gestagen の分泌異常が排卵前後に生じた場合には受精障害あるいは受精卵の死滅を招き、これが妊娠初期に生じた場合には胚の早期死滅を招くことが示唆された。