

113

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

百目鬼 郁男

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

百目鬼 郁男

目 次

第1章	緒言	1
第2章	性周期における牛末梢血中 estrogen および gestagen の動態 — とくに生物学的測定法に関する検討 —	12
	緒言	12
	第1節 実験材料ならびに方法	13
	1. estrogen の測定	13
	1). 試薬	13
	2). 実験牛および血液材料	13
	3). 抽出法	14
	4). 測定法	14
	2. gestagen の測定	16
	1). 試薬	16
	2). 実験牛および血液材料	17
	3). 抽出法	17
	4). 測定法	18

3.	卵巢の変化	19
第2節	実験成績	21
1.	卵巢の変化	21
2.	性周期における estrogen の動態	22
3.	性周期における gestagen の動態	22
第3節	考 按	26
第4節	小 括	29
第3章	性周期における牛末梢血中 estrogen 及び progesterone の動態 —とくに蛍光測定法による検討—	31
緒 言		31
第1節	実験材料ならびに方法	33
1.	estrogen の測定	33
1).	試薬	33
2).	実験牛および血液材料	34
3).	estrogen の抽出ならびに分 画測定法	34
2.	progesterone の測定	38
1).	試薬	38

- 2). 実験牛および血液材料 39
- 3). progesterone の抽出ならび
に測定法 40

第2節 実験成績 43

1. estrogen の測定 43

1). 測定法の検討 43

a. Jttrich color の蛍光特性 43

b. 蛍光の安定性 44

c. 感度 45

2). 性周期に比ける動態 45

2. progesterone の測定 50

1). 測定法の検討 50

a. 薄層クロマトグラフィー
の展開溶媒 51

b. 20β -hydroxy-steroid-dehydrogenase
の活性 52

c. 20β -hydroxy-steroid-dehydrogenase
の特異性 52

d. 蛍光発色条件の検討 52

e. 蛍光特性 54

f.	シリカゲル盲検値	54
g.	感度	54
2).	性周期における動態	55
第3節	考 按	60
1.	estrogen の測定	60
1).	測定法について	60
2).	血中動態について	62
2.	progesterone の測定	64
1).	測定法について	64
2).	血中動態について	66
第4節	小 括	68

第4章	性周期における牛末梢血中 estrogen, progesterone, 17 α -hydroxy- progesterone とよび 20 β -hydroxy-pro- gesterone の動態 — くに radio- immunoassay 法による検討 —	72
-----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

緒 言		72
第1節	実験材料ならびに方法	73

1.	estrogen の測定	73
1).	試薬および器具	73
2).	抗原の合成および抗血清 の作製	75
3).	測定法	75
a.	抽出, 分離精製	76
b.	radioimmunoassay 法	76
c.	結合率ならびに測定値 の算出法	78
4).	実験牛および血液材料	79
2.	progesterone の測定	80
1).	試薬および器具	80
2).	progesterone-3-oxime-bovine serum albumin の合成および抗血清	82
3).	測定法	82
a.	抽出, 分離精製	83
b.	radioimmunoassay 法	83
4).	competitive protein binding 法	85
5).	蛍光法	86
6).	実験牛および血液材料	87

3.	17 α -hydroxy-progesterone による	
	20 β -hydroxy-progesterone の測定	88
1).	試薬	88
2).	17 α -hydroxy-progesterone-oxime- bovine serum albumin, 20 β -hydroxy- progesterone-oxime-bovine serum albumin の合成および抗血 清の作成とその特徴	89
3).	測定法	90
	a. 抽出, 分離精製	90
	b. radioimmuno assay 法	91
4).	実験牛および血液材料	93
	第2節 実験成績	94
	1. estrogen	94
	1). 測定法の検討	94
	a. 標準曲線	94
	b. 抗血清の特異性 (交叉反応)	94
	c. 精度ならびに測定感度	95
	d. 分離, 精製	96

2). 性周期に比ける動態 96

2. progesterone 109

1). 測定法の検討 109

a. 抗血清の力価 109

b. 抗血清の特異性
(交叉反応) 110

c. 精度ならびに測定感度 111

d. フロマト法および直接
法による測定値の比較 111

e. progesterone 回収率 112

2). radioimmunoassay 法, 蛍光
法および competitive protein
binding 法による測定値の
比較 112

3). 性周期に比ける動態 113

4). とくに発情期に比ける動態 120

3. 17 α -hydroxy-progesterone ならび
に 20 β -hydroxy-progesterone 120

1). 測定法の検討 120

a. 標準曲線 120

b.	抗血清の特異性	121
c.	精度ならびに測定感度	121
d.	分離精製	122
2).	性周期における動態	123
3).	とくに発情期における動態	123
第3節 考 按		133
1.	estrogen	133
1).	測定法について	133
2).	血中動態について	135
2.	progesterone	137
1).	測定法について	137
2).	血中動態について	139
3.	17 α -hydroxy-progesterone ならび に 20 β -hydroxy-progesterone	141
1).	測定法について	141
2).	血中動態について	143
第4節 小 括		145

第5章	妊娠初期における estrogen, progesterone, 17 α -Hydroxy-progesterone および 20 β -Hydroxy-progesterone の動態 —とくに radioimmunoassay 法による検討—	149
緒言		149
第1節	実験材料ならびに方法	150
1.	estrogen の測定	150
1).	試薬, 器具, 抗血清および 測定法	150
2).	実験牛および血液材料	150
2.	progesterone の測定	151
1).	試薬, 器具, 抗血清および 測定法	151
2).	実験牛および血液材料	151
3.	17 α -Hydroxy-progesterone および 20 β -Hydroxy-progesterone の測定	151
1).	試薬, 器具, 抗血清および 測定法	152
2).	実験牛および血液材料	152
第2節	実験成績	152

1. 妊娠初期に比ける estrogen の
動態 152

2. 妊娠初期に比ける progesterone
の動態 154

3. 妊娠初期に比ける 17α -hydroxy-
progesterone と 20β -hydroxy-progesterone
の動態 154

第3節 考 按 161

1. 妊娠初期に比ける estrogen の
動態 161

2. 妊娠初期に比ける progesterone
の動態 163

3. 妊娠初期に比ける 17α -hydroxy-
progesterone と 20β -hydroxy-pro-
gesterone の動態 163

第4節 小 括 165

第6章 リポートブリッターに比け
る授精前後，妊娠初期の末
梢血中遊離estrogen と 17α -

gestagen の動態

— とくに生物学的測定法に関する検討 —

167

緒言

167

第1節 実験材料ならびに方法

168

1. 供試件

168

2. 生殖器の検査

169

3. 血液材料ならびに性ステロ

イドの測定法

169

第2節 実験成績

170

1. 生殖器の検査

170

2. 授精前後の血中遊離性ステ

ロイドの消長

172

1). estrogen

172

a. 胚が存在しなかった例

172

b. 死亡胚が存在した例

173

c. 正常胚が存在した例

173

2). gestagen

174

a. 胚が存在しなかった例

174

b. 死亡胚が存在した例

175

c. 正常胚が存在した例

176

3. estrogen ならひに gestagen の消
長と受胎性との関係

177

第3節 考 按

185

第4節 小 括

191

第7章 総合考按

194

第8章 総括ならひに結論

212

謝 辞

218

文 献

219

第1章 緒言

牛の繁殖障害のなかで、リポートブリーダーは卵巢疾患、子宮疾患などとならび繁殖を阻害する主要なものとして重視されている。わが国に於ける牛リポートブリーダーの発生率は全繁殖牛の10~15%と推定されており、これによる経済的損失は甚大である。

リポートブリーダーとは一般の臨床繁殖検査によつて生殖器に異常が認められなにもかかわらず、3回以上の授精によつて受胎しない牛を統括している。この中には授精後の性周期が正常あるいはほぼ正常に管まれるものの他に、授精後1~2周期相当期間を経て不規則に再発情するものも含まれている。

リポートブリーダーの不受胎の原因は、米国立ウィスコンシン大学の Casida¹⁾ 一派の広範な研究によつて追究されている。すなわち Tanabe, Casida¹⁾ はリポートブリーダー104頭に人工授精を行ない、その半数を授精後3日月に解

剖して卵子の分割状態を調べ、残りの半数と授精後34日目に解剖して胎児の発育状態を調べて、この両時期の間における胚の死亡率が65.1%であったことを認めている。さらに Hawk, Casida²⁾ はリポートブリーダー²⁾ - 100頭を用い、授精後16日および34日目にその半数ずつを解剖し、その間における胚の死亡率を51.5%と推定し、これらのことからリポートブリーダーの主な原因が受精卵、胚の早期死滅にあるとしている。これ以来、胚の早期死滅の原因は遺伝、生殖器の感染、炎症、ホルモンの分泌異常、あるいは受精卵の細胞質的欠陥、免疫因子など種々の面から追求されているが、あまたの原因のなかでとりわけ重視されているのは細菌感染^{3~10)}と内分泌異常であり、とくに内分泌要因としては estrogen および gestagen の分泌異常について関心が持たれている。

性周期においてこれら両性ステロイドは主として卵巢、一部は副腎から分泌され、副生

殖器各部位に作用するほか、他の内分泌器官に対しても密接な関係を持ち、性機能の周期的活動に与かり、また妊娠期には胎盤からも分泌され、胚の着床、妊娠維持、分娩発来に与かる重要なホルモンである。

estrogen は発情期に比しては、発情の発現、粘液の分泌に与かり、特に子宮頸管粘液の結晶形成、精子受容性の良否等に直接関係している。

芦田^{11,12)}は子宮頸管粘液の羊歯状、樹枝状の結晶像は正常牛では発情期を中心に数日間しか見られないが、リポートブリーダーの中には黄体期にも陽性像を示すものがあり、これらの牛の卵巣には大卵胞の共存するものが多いことを認めている。芦田はこのような牛を estrogen 過剰症と診断して、臨床処置として progesterone と投与すると結晶像が消失して、受胎性が向上することを認めている。また一般に子宮頸管粘液の精子受容性は黄体期に低いが、発情期には高くなり、このことが精子

の運動性、生存性および粘液中の通過に好結果をもたらしていることが知られている。子宮頸管粘液のこのような生物学的性状の周期的変化は粘液組成の変化に基づくものであり^{13,14)}、これには estrogen ならびに gestagen^{15~17)} の両ホルモンが関与していると云われているが、高嶺¹⁵⁾らはリポートブリーダーの中には発情期の子宮頸管粘液の精子受容性が不良であるものが多いことを指摘している。

排卵した卵子が受精能を獲得し、さらに精子と邂逅して受精卵となり、子宮に着床するまでの間、すなわち卵が卵管から子宮へ移動する過程で卵管はきわめて微妙な役割を演じている。すなわち体液中の estrogen および gestagen が量的に不足、または過剰であったり、あるいは両者の均衡が適正でない場合には受精卵の卵管通過が停滞したり、または急速に下降して、このことが受精卵死滅の原因となる可能性が示唆されている。さらに Foote¹⁸⁾らはリポートブリーダーの黄体組織中の pro-

gesterone 総含量は正常牛のそれと比べて少ない
 ことを認め、また Randel^{19,20)}らは不妊牛の尿中 est-
 rogen 値は妊娠牛のそれよりも高いと述べてお
 り、estrogen, gestagen の分泌異常が胎児の早期
 死滅と密接な関係にあることを示している。
 しかしこれらの点を詳細に追求した報告は未
 だ見当らない。一方、リポートブリーダ
 ーに対する progesterone 製剤の治療効果につ
 いては、これを肯定する報告^{11,21~27)}も、否定する報告^{28,29)}
 もある。このことは estrogen, gestagen の分
 泌異常と不受胎の関係は分泌ホルモンの種類
 、量、相互の均衡、あるいは作用時期によ
 てかなり異なり、かつ複雑であることを示唆
 するものである。

ところで牛の体液中の性ステロイドの濃度
 は繁殖の各時期を通じて全般に低いために、
 従来その測定はきわめて困難なものとされて
 いる、estrogen および gestagen については、
 比較的感度の高い生物学的手法が応用されて

いた。しかし近年、性ステロイドの測定にアイソトープが導入され、さらにガスクロマトグラフィ—ならびに放射免疫学的手法が開発されるに至り、化学的測定法、competitive protein binding assay 法ならびに radioimmunoassay 法などの近代的手法が生物学的的手法に代って応用されるようになってきた。

性ステロイドの生物学的測定に関しては、1923年 Allen & Doisy³⁰⁾ が estrogen について、1929年 Corner & Allen³¹⁾ が gestagen について初めてその方法を確立して以来、多くの方法が報告されている。³²⁻⁴⁰⁾ その中でも被検材料をマウス腔内に注入する Sulman の estrogen 測定法³²⁾、マウスの子宮内に直接注入する Hooker-Forbes らの gestagen 測定法³⁹⁾ の感度はきわめて高く、両測定法はそれぞれ体液中の estrogen および gestagen の動態究明のための優れた方法として広く応用されていた。これらの生物学的測定法においては分画抽出を行わずに粗抽出物を被検材料として用いているために、得られた測定

値についてはその特異性に多少の疑義が持たれている。しかしながら、未知分画を含む雌性ステロイドの生物学的活性を数量的に表現しうるこれら測定法は、分画測定法とは異なる意味で、その価値が評価されている。

estrogen および gestagen の作用機序ならびに代謝機構を解明してその生理的意義を究明するには分画測定と測定値の精度が要求されるが、1960年代の終り頃からこの条件を満す方法としてアイトープロロおよびフロマト技術等を応用した化学的測定法が行なわれるようになった。

estrogen の化学的測定に關しては、比色法⁴¹⁾にもとづく Brown の hydroquinone-Kober 法⁴²⁾、Ittrich-Kober 法、あるいは Preedy-Aitken による蛍光法⁴³⁾などは比較的多く応用されている。hydroquinone-Kober 法は高い特異性を有する信頼性のある測定法であるが、この方法は感度が低いために、微量の estrogen⁴²⁾ の測定に適用することはできない。Ittrich は estrogen の

Kober chromogen のみを抽出して比色測定する方法が感度、特異性ともに前者より優れていることを報告している。さらに Roy⁴⁴⁾ は比色法の高い特異性と蛍光法の高感度とをとり入れた Strick 蛍光法と応用して、この方法によりきわめて微量の血中 estrogen を測定し得ることを報告している。

また、progesterone の化学的測定法に關しては近年急速に進歩しつつあるが、なかでも 20 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase により progesterone を 20 β -hydroxypregn-4-en-3-one に転換して測定する Heap の方法⁴⁵⁾ は感度、特異性ともに優れている。

このように化学的測定法は感度、特異性ともに優れているが、その操作が煩雑であり、しかも高度の技術を必要とするために、家畜の臨床繁殖研究分野では広く応用されるまでには至っていない。

1963 年、Murphy⁴⁶⁾ はステロイドの測定法としてホルモンと蛋白の特異的な結合を利用す

る方法, すなわち corticosteroid を特異的に結合する血漿中の corticosteroid binding globulin を用いて微量の血漿中に含まれる cortisol を簡便に測定する competitive protein binding assay 法を開発した。その後 testosterone binding globulin を用いる testosterone の測定法, 子宮 cytosol fraction 中にある estrogen の receptor protein を利用する血漿中の estrogen 測定法, さらに妊娠モルモットの血漿中に存在する progesterone binding protein を用いて progesterone を測定する方法などが開発された。しかし結合蛋白質は一般に入手が容易であり反面, その安定度, 結合能の特異性, 結合力などすべてを具備したものは少なく, 必ずしも満足すべき測定法とは言えない。

いっぽう免疫化学の進歩につれて種々の蛋白質性ホルモンの radioimmunoassay が可能になったが, 最近では低分子物質であるステロイドについても radioimmunoassay による測定技術が著しく進歩してきた。すなわち合成したステ

ロイド蛋白質結合物で動物を免疫して、ハプロテン基であるステロイドに特異的な抗体を作成することによつて、ステロイドの radioimmunoassay への道が拓かれた。性ステロイドの radioimmunoassay に関しては 1969 年、Abraham⁴⁷⁾ が estradiol-17 β について始めて報告して以来、種々の性ステロイドについて追求されてゐる。しかし、牛の血中ステロイド濃度はきわめて低いのでこれを詳細かつ精度高く測定した報告は数少ない。

本研究では牛に於ける受精障害、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を究明する目的で、まず牛の血中 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、ついでこれらの方法ならびに従来の生物学的測定法を応用して、実験牛について性周期および妊娠初期に於ける末梢血中 estrogen および progesterone

、 20β -hydroxy-progesterone, 17α -hydroxy-progesterone
などの gestagen の動態を明らかにした。さらに
農家から導入したリポートブリーダー牛につ
いて、授精後 15~28 日の間に屠殺解剖して胚
の存在、その発育状態を調べるとともに授精
前から屠殺時までの血中 estrogen, gestagen
の動態を追究し、不受胎に関わるこれらの性ス
teroid の分泌異常の現われ方の一端を明ら
かにした。

第二章 性周期における牛末梢血中 estrogen とよび gestagen の動態 —とくに生物学的測定法による検討—

緒言

前章で述べたように生物学的測定法は標的臓器に対する特異的な反応を数量的に表現しうる特長があり、かつ感度がきわめて高いことから、現在もなおその価値が認められている。

estrogen ならびに gestagen の生物学的測定法に關しては多くの方法³²⁻⁴⁰⁾があるが、なかでも被検材料をマウスの腔内に注入する Sulman の estrogen 測定法³³⁾、マウス子宮内に直接注入する Hooker-Horbes らの gestagen 測定法³⁹⁾は体液中の微量のホルモンを測定しうる優れた方法である。

本章では、これらの方法を応用して、実験牛に於いて性周期における末梢血中遊離 est-

rogen ならびに gestagen の動態を検討した。

第1節 実験材料ならびに方法

1. estrogen の測定

1). 試薬

estrogen の抽出には試薬特級のアセトン、
エーテルと、注入試料の希釈には同じく試薬
特級のプロピレングリコールを使用した。マ
ウスの反応性検定に使用した estrone は国立
衛生試験所の標準品である。

2). 実験牛および血液材料

供試牛は年令 7~13 歳の正常性周期を示す
黒毛和種経産牛 3 頭である。ホルモン測定に
用いた血液材料は一性周期の間、連日あるい
は 1~2 日の間隔で頸静脈より採取したクエ
ン酸ソーダ加(1:20)血液統計⁴⁸⁾ 39 例である。血漿の

分離は採血後直ちに行ない、分離血漿は測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。

3) 抽出法

estrogenの抽出は血漿に2倍量のアセトンを加えて、はげしく振盪し、除蛋白および抽出を同時に行なったのち $3,000\text{rpm}$ で10分間遠沈して上清を取り、さらに沈渣に2倍量のエーテルを加えて再抽出を行なった。アセトンおよびエーテル層を加温濃縮し、これをプロピレンジリコールで適宜希釈して測定材料とした。

4) 測定方法

estrogenの測定は Sulman の方法³³⁾に準じて行なった(表2-1)。

測定に使用した動物は市販の成熟雌マウス(DD系雑, 体重 $20\sim 35\text{g}$)である。まず卵巣を

割去して、ついで estrogen に対する反応性を検査するために3週間後に estradiol 水溶性注射液 20 単位を朝夕2回皮下注射し、臍垢検査によつて発情期像出現の有無を検査し、陽性反応を呈し、かつ2週間後に角化上皮細胞がほとんど消失したものを測定に使用した。なお大多数のマウスは反復測定に使用されたが、その場合にはその都度 estrogen に対する反応性を検査した。

検体の臍内注入にはワベルクリン用注射器を装置した微量注入器を用いた。注射器には先端を鈍性にした注射針が装着された。検体の射出は注入器附属のマイクロメーターのハンドルを回転操作することによつて行なつた。なお回転目盛と射出容量との関係はあらかじめ水銀を用いて検定された。マウス臍内に注入された検体の用量は1回量 0.0075 ml で、1日2回、2日間計4回、全量 0.03 ml である。

反応の判定は藤井らの方法³⁶⁾に準じて行なつ

た。すなわち初回注入後 48, 60, 72 時間
に 3 回、蒸留水を吸引したスポイトを用いて腫
瘍を洗浄採取し、これをスライドガラス上に
滴下した後、風乾、メタノール固定、ギムザ
染色を施して鏡検した。判定は角化上皮細胞
が有核上皮細胞に比較して明らかに多いもの
を陽性とし、5 区中 3 区以上陽性反応を示す
用量を最少有効量として、これを倍数希釈法
により反復測定して求めた。

本法により、純 estrone を測定した結果、そ
の最少有効量は $1/5,000 \mu\text{g}$ であった。従って
検体の estrogen 量は estrone 量に換算して
 $\mu\text{g/l}$ で示した。

2. gestagen の測定

1) 試薬

gestagen の抽出には試薬特級アセトンを、

注入試料の希釈には局方ゴマ油を使用した。
マウスの反応性検定に使用した progesterone は
国立衛生試験所の標準品である。

2) 実験牛および血液材料

供試牛は estrogen 測定用の血液材料を採取し
た牛と同じで黒毛和種経産牛3頭である。ホ
ルモン測定に用いる血液材料は一性周期の間
連日あるいは1~2日の間隔で頸静脈より採
取したクエン酸ソーダ加(1:20)血液統計37
例である。血漿の分離は採血後直ちに行ない
、分離血漿は測定時まで -20°C の冷蔵庫に保
存した。

3) 抽出法

gestagen の抽出は血漿に10倍量のアセトン
を加えてはげしく振盪し、除蛋白および抽出
を同時に行なったのち3000 rpm で10分間遠沈

して上清をとり加温濃縮し、これをゴマ油で適宜希釈し測定材料とした。

4). 測定法

gestagen の測定は Hooker-Forbes の方法³⁹⁾に準じて行なった (表 2-2)。

測定に使用した動物は市販の成熟雌マウス (DD系雑, 体重 18~23g) で、卵巣除去後 16~25日を経過してからエーテル麻醉下で開腹し、あらかじめ第1結紮を施した一側子宮角内にゴマ油に溶解した検体 0.0006 ml を前項で述べた微量注入器を用いて注入し、注入部位の後端で第1結紮との間隔が 5 mm になる所で第2結紮を行なった。注入後 48時間 にマウスを解剖して、注入子宮角ならびに対側の無処置の対照角を切除して、これを Lavdowsky 氏液で固定し、常法によって 4 μ のパラフィン切片を作り、ヘマトキシリン・イオジン染色を施して鏡検した。

反応の判定は子宮粘膜上皮層に近い間質の細胞を対照子宮角のそれと比較観察して行なった。すなわち gestagen に反応した間質細胞核は胞状に肥大して球形または楕円形を示し、プロマチンは微細顆粒として核内に均等に分布して網状構造を示し、核小体は著明に見得るようになる。この条件に合った間質細胞核が多数分布しているものを反応陽性とし、3匹中2匹以上陽性反応を示す用量を最少有効量として、これを倍数希釈法により反復測定して求めた。

本法により純 progesterone を測定した結果、その最少有効量は $1/5,000 \mu\text{g}$ であった。従って以下検体の gestagen 量は progesterone 量に換算して $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示した。

3. 卵巣の変化

ホルモン測定用血液材料の採取期間中は連

Table 2-1. Main steps of biological assay methods for determination of estrogen in blood plasma

1. Extract with acetone and remove protein by centrifugation
2. Reextract with ether and remove protein by centrifugation
3. Evaporate an aliquot of the supernatant
4. Dissolve residue in propylene glycol
5. Evaluate by vaginal smear test

Table 2-2. Main steps of biological assay methods for determination of gestagen in blood plasma

1. Extract with acetone and remove protein by centrifugation
2. Evaporate an aliquot of the supernatant
3. Dissolve residue in sesame oil
4. Inject into the uterine horn
5. Evaluate by histological examination of endometrium

日あるいは1~2日の間隔で直腸検査を行なって卵巣の変化、すなわち卵胞の発育、排卵ならびに黄体の発育、退行の状態を追跡観察した。

第2節 実験成績

性周期に於ける3頭の牛 (Nos. 42, 45, 58) の血中 estrogen 及び gestagen の消長ならびに卵巣の変化を図2-1~3 に示した。

1. 卵巣の変化

実験期間中に於ける3頭の牛の性周期は22~25日で卵胞の発育、排卵、黄体形成はいずれもほぼ正常と認められた。しかし牛No. 42には排卵後4日ないしは日の黄体期に、直径12~14 mmの1個の大卵胞が存続したことが注

目された。

2. 性周期に比ける estrogen の動態

estrogen 値は排卵後 1~4 日に最低値 (0.28 ~ 0.42 $\mu\text{g/L}$) を示したが、その後 3~7 日目から増加しはじめ、7~13 日の間に最高値 (3.34 ~ 8.90 $\mu\text{g/L}$) に達し、16~19 日にかけて減少した (0.56 ~ 2.23 $\mu\text{g/L}$)。その後、発情期に急激に増加し、排卵前 2~3 日に鋭いピーク (3.34 ~ 8.90 $\mu\text{g/L}$) を形成し、排卵日には急激に減少して低値 (0.21 ~ 0.84 $\mu\text{g/L}$) を示した。個々の牛に比ける血中 estrogen の動態は、その濃度水準、ピーク形成の時期ならびに低下開始の時期がそれぞれかなり異なることが注目された。

3. 性周期に比ける gestagen の動態

Fig.2-1. Ovarian changes and level of plasma estrogen and gestagen in the cow during the estrous cycle

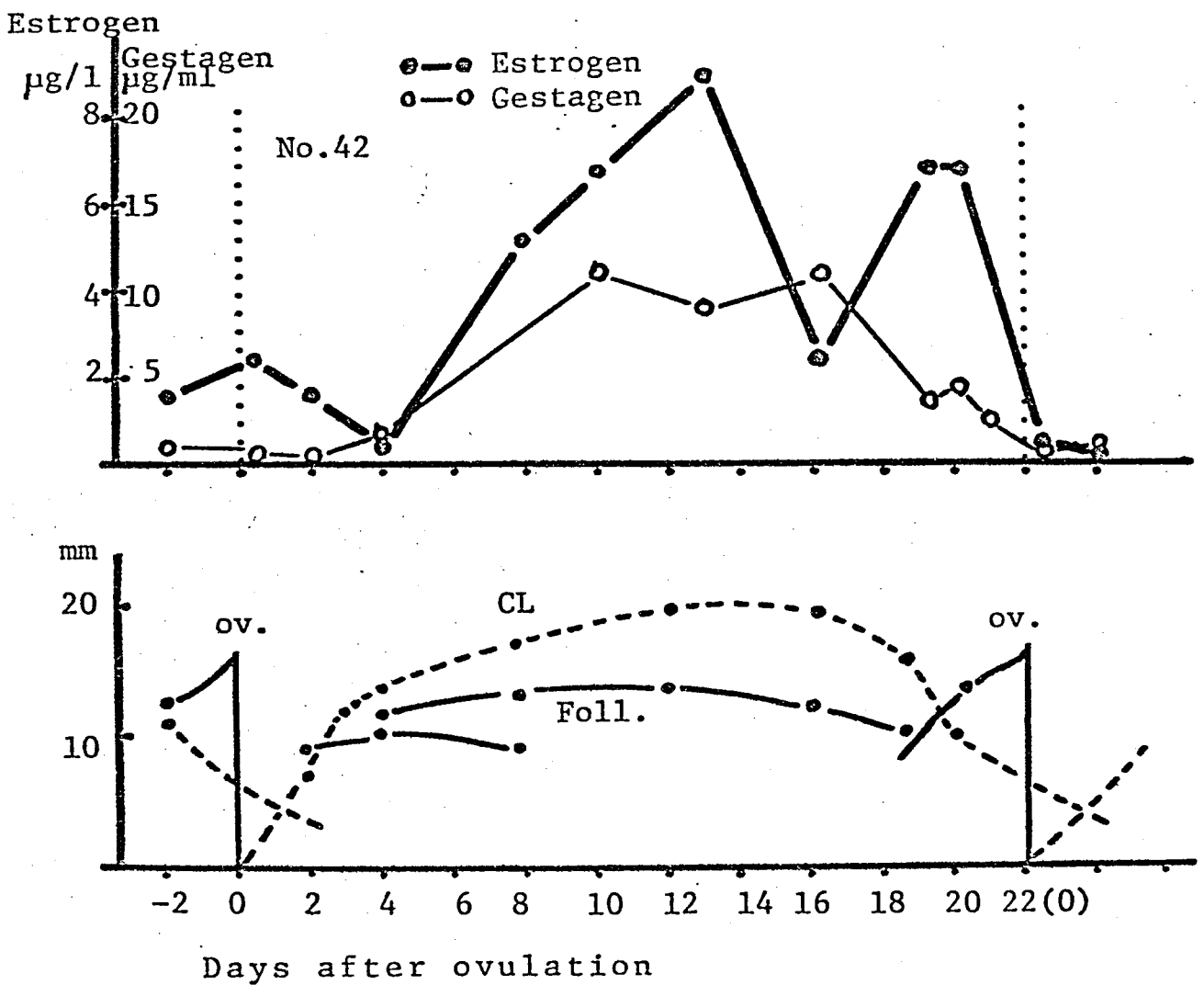


Fig. 2-2. Ovarian changes and level of plasma estrogen and gestagen in the cow during the estrous cycle

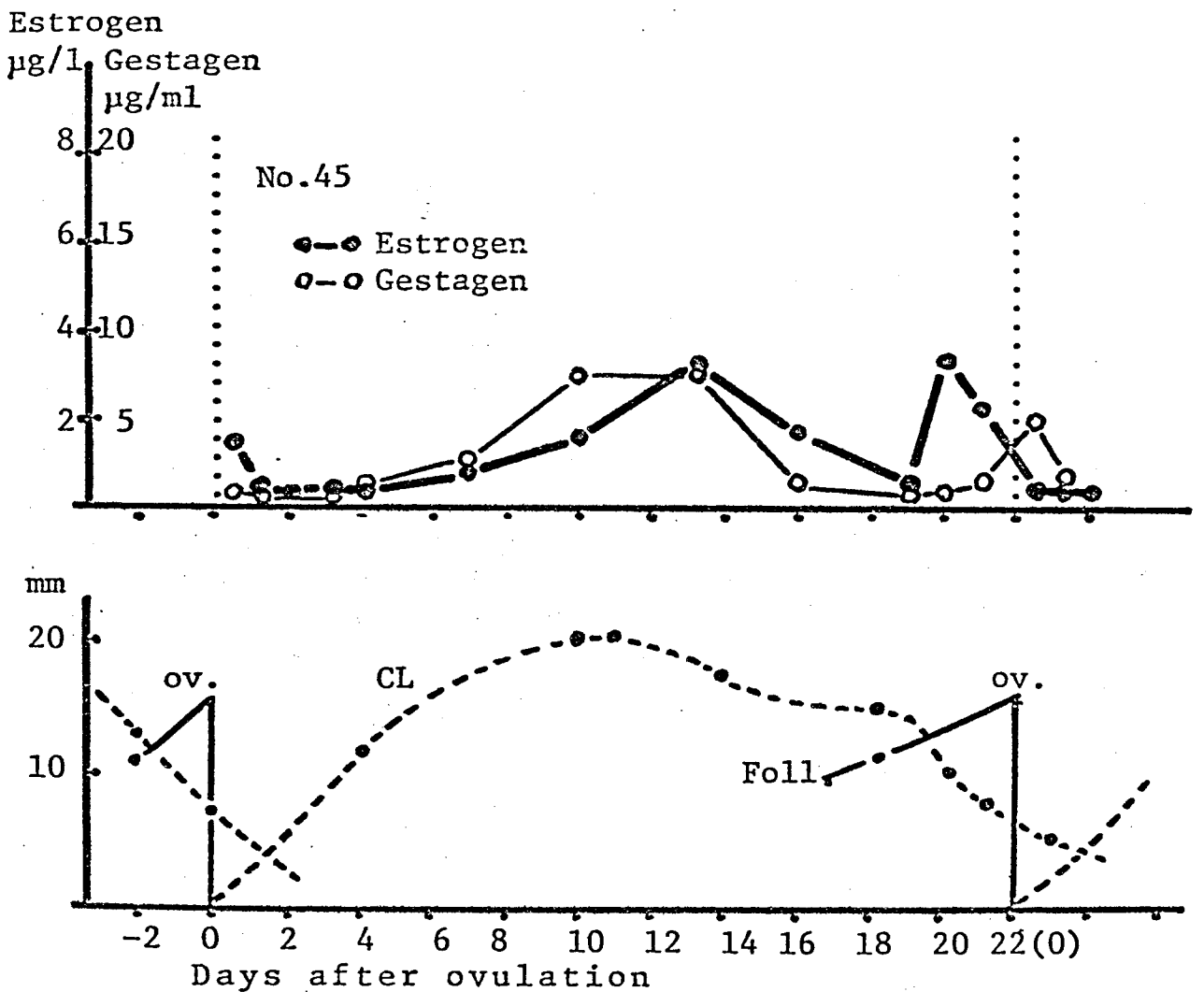
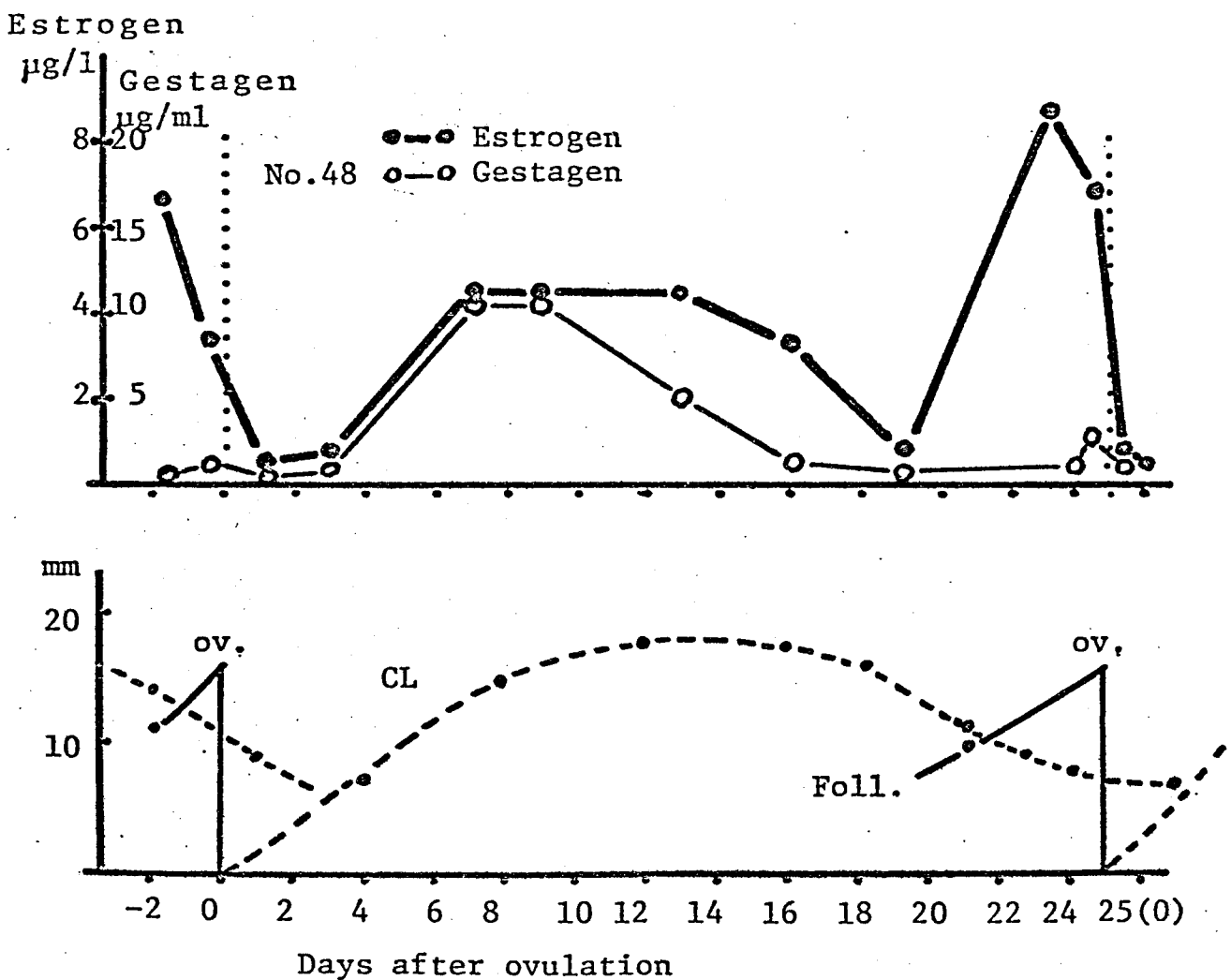


Fig.2-3. Ovarian changes and level of plasma estrogen and gestagen in the cow during the estrous cycle



gestagen 値は排卵後 1~2 日の間は低値 (0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であったが、3~4 日目頃から増加 (0.67 ~ 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) しはじめ、7~10 日の黄体期に最高値 (8.00 ~ 10.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に達した。この値を 2~6 日間持続して、次の排卵前 3~9 日には減少した (0.50 ~ 2.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。しかし発情期にはふたたび増加して、黄体期にくらべて低いながらもピークを形成した。このピークは Nos. 42 および 48 では排卵前日あるいは前々日に、No. 45 では排卵当日にみられ、estrogen のピークより若干遅れて現われる傾向がみられた。個々の牛における血中 gestagen の動態は、estrogen と同様はその濃度水準、ピーク形成の時期ならびに低下開始の時期がかなり異なることが認められた。

第 3 節 考 按

生物学的測定法により、性周期における牛血

中 estrogen, gestagen の動態を調べた報告は数少ない。本実験に於いて estrogen 値は排卵後に最低値を示し、数日後の黄体初期から増加しはじめ、排卵後 7~13 日の黄体開花期にピークを形成した。その後黄体の退行に伴って減少し、発情前期から卵胞の発育に伴って急激に増加して、排卵前 2~3 日にふたたび鋭いピークを形成することと認められた。⁴⁹⁾ この成績は小笠原⁵¹⁾および山内、松垣⁵⁰⁾および菅、岸⁵⁰⁾および岩口の報告とほぼ同様である。このように黄体期に於いて血中 estrogen 値が黄体の発育にほぼ一致して増減することは注目されることである。この時期に於ける estrogen の分泌源としては黄体、副腎あるいは大小の卵胞などが考えられるが、牛に於いて黄体あるいは副腎から多量の estrogen が分泌されることを示唆している報告はみられない。⁵²⁾ 百目鬼らは黄体開花期に存在する卵胞液中の estrogen 含量は発情期に於ける同程度の大きさの卵胞のそれにくらべて低いことを認めているが、牛 No. 42

には、黄体期に大卵胞の発育がみられ、この例はとくに高い estrogen 値を示したことが注目された。芦田¹²⁾は黄体初期～黄体退化期にしばしば発育する大卵胞が大量の estrogen を分泌することを示唆している。これらのことから、個体によってはその分泌相に差があることも考えられ、今後追求を要する興味深い問題である。

gestagen 値は黄体初期から黄体退化期にかけては直腸検査による黄体の形状変化にほぼ一致して増加して、黄体退化期に高いピークを形成した。また次の排卵の数日前から減少したが、この低下の時期は個体によりかなり差違のあることが注目された。この黄体期における血中 gestagen 値の動態は同じく生物学的測定法で測定した小笠原⁵³⁾と山内⁵³⁾、ならびに松垣⁵⁰⁾の成績とほぼ一致している。いわゆる黄体の退行に伴っていったん低下した gestagen 値は、排卵前々月ならし排卵日にかけて、つまり estrogen 値のピーク形成時期より

若干遅れて低い明瞭なピークを形成した。
 この発情期における gestagen 値の動態については松垣ら⁵⁰⁾の成績には認められていないが、小笠ら⁵³⁾は認めている。本実験では Hooker-Forbes 陽性物質を gestagen としているが、この反応を示すものは progesterone の外に 20β -hydroxy-progesterone, 17α -hydroxy-progesterone などがあることが知られている。従ってこれらのいずれかが牛の発情期に増加している可能性が推察される。これら gestagen の動態、分泌源ならびに生理的意義について知ることはきわめて重要なことと考えられる。

第4節 小 括

黒毛和種雌牛3頭について性周期における末梢血中 estrogen および gestagen の動態を生物学的測定法により追究して次の成績を得た。

1. estrogen は発情期 ($3.34 \sim 8.90 \mu\text{g/L}$) および排卵後 7~13 日の黄体期 ($3.34 \sim 8.90 \mu\text{g/L}$) に最高値, 排卵後 1~2 日の発情後期に最低値 ($0.28 \sim 0.42 \mu\text{g/L}$) を示した。

2. gestagen 値は発情期 ($2.67 \sim 5.33 \mu\text{g/mL}$) および黄体期 ($8.00 \sim 10.67 \mu\text{g/mL}$) にそれぞれピークを形成し, かつこれらのピークは発情期には estrogen のそれより若干遅れて黄体期には両者ほぼ一致して発現することを認められた。

3. 個々の牛における血中 estrogen および gestagen の動態は濃度水準, ピーク形成の時期ならびに低下開始の時期がかなり異なることが認められた。

第3章 性周期における牛末梢血中 estrogen および progesterone の動態 —とくに蛍光測定法による検討—

緒言

estrogenの化学的測定法に關しては従来より多数の報告がある。なかでも比色法にもとずく Brown⁴¹⁾による hydroquinon-Kober法, Attrich⁴²⁾-Kober法あるいは Preedy-Aitken⁴³⁾による蛍光法などは比較的多く応用されている。Roy⁴⁴⁾は比色法の高い特異性と蛍光法の高感度とをとり入れた Attrich 蛍光法を応用して、この方法によりきわめて微量の血中 estrogen を測定し得ることを報告している。しかし牛の血中 estrogen の濃度はきわめて低いので、これを化学的に分画測定した報告は数少ない。^{54,55)} 一方 progesterone については特異的な呈色反応がないので、これを化学的に測定することはきわめて困難とされており、とりわけ濃度が低い

牛の血中 progesterone を測定することはほとんどの不可能と考⁴⁵⁾えられていた。ところが 20β -hydroxysteroid-dehydrogenase により progesterone を 20β -hydroxy-progesterone に転換して蛍光測定する Heap の方法は感度、特異性ともに優れているので、この方法により牛の血中 progesterone を測定し得るのではなからうかと考えられた。

本実験では牛体液中の性ステロイドを化学的に測定する目的で、estrogen については Ittrich 蛍光法、progesterone については Heap の蛍光法を応用して、それぞれについてホルモンの純化操作および発色条件などに 2, 3 の検討を加え、さらにこれにより性周期における牛末梢血中 estrogen ならびに progesterone を測定した。

第1節 実験材料ならびに方法

1. estrogenの測定

1). 試薬

抽出あるいはクロマトグラフィーに用いた溶媒は、すべて試薬特級で、使用前に再蒸留した。回収率補正には 6,7-³H-estradiol-17 β (S.A. 40 C/mM; New England Nuclear Corp.) を用いた。カラムクロマトグラフィーに使用したアルミナは中性、活性度 I (Woelm) のものである。アイソトープの測定に用いたシンチレーターの作製にはシンチレーション用の PPO, POPOP およびトリエンを使用した。標準品として用いた estrone, estradiol-17 β および estriol はすべて帝国臓器製薬(株)から提供を受けたものである。その他の試薬はすべて特級あるいはステロイド測定用のものを用いた。

2). 実験中および血液材料

estrogen測定用の検体とした牛血液は、正常性周期を示す黒毛和種経産牛2頭から、1周期にわたる、連日あるいは隔日に頸静脈から採取(1回量500~1,260 ml)した統計36例である。血液は採取後ただちに3,000 rpm.で30分、室温で遠心分離して、分離血漿は測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。なお血液の凝固防止剤としてヘパリンを使用した。

3). estrogenの抽出ならびに分画測定法

estrogen測定法の概要を表3-1-1に示した。回収率補正のために血漿に6,7- ^3H -estradiol-17 β (牛No.58の血漿には226,000 dpm/0.69 ng, 牛No.64の血漿には158,000 dpm/0.48 ng)を加え、Shortの方法⁵⁶⁾によりアルカリ性血漿からエーテルでestrogenを抽出した。エーテルを蒸発乾固したのち、Zander & Simmerの方法⁵⁷⁾により70%

メタノールで脂質を除去する。冷却遠心して得られた上清を蒸発乾固したのち、残渣をエーテル 100 ml で溶かし、分液漏斗に移す。これに 8% NaOH 10 ml, ついで 8% NaHCO₃ 30 ml を加え振盪したのち水層を捨てる。ここで蒸留水 5 ml で 2 回エーテル層を洗浄し、これを蒸発乾固する。残渣にエタノール 1 ml, ベンゼンおよび n-ヘキサン各 25 ml を加え、これからまず蒸留水 25 ml (2 回) で estriol 分画を抽出し、ついで 1.6% NaOH 25 ml (2 回) で estrone および estradiol-17 β 分画を抽出する。

ついで各画分についでメチル化を行なう。すなわち H₃BO₃ 0.9 g, (CH₃O)₂SO₄ 1 ml, 20% NaOH 10 ml, 30% H₂O₂ 2.5 ml を加え、estriol 画分についで は ベンゼン, estrone および estradiol-17 β 画分についで は n-ヘキサンそれぞれ 25 ml で 2 回抽出する。これを軽く水洗したのち、Na₂SO₄ を加え脱水し蒸発乾固する。画分精製のためのカラムクロマトグラフィ⁵⁸⁾ は Roy & Brown の改良法に従った。すなわち 8% の割

に水を加えて活性をととしたアルミナ 0.7gと、estriol 画分の精製にはベンゼンを用い、また estrone, estradiol-17 β 画分の精製には *n*-ヘキサンを用いて、内径 6 mm, 長さ 100 mm, 容量 25 ml のカラムに流し込む。各画分の抽出物はそれぞれ同じ溶媒 10 ml による溶解、カラム注入を繰り返して、アルミナに吸着させた。estriol 画分は 1.4% エタノール・ベンゼン 3 ml で予洗浄したのち 2.5% エタノール・ベンゼン 7 ml で溶出して micro Kober tube に受けた。estrone, estradiol-17 β 画分については、25% ベンゼン・*n*-ヘキサン 4 ml で予洗浄したのち 40% ベンゼン・*n*-ヘキサン 6 ml を用いて estrone を、つぎに 40% ベンゼン・*n*-ヘキサン 4 ml を流したのちベンゼン 6 ml を用いて estradiol-17 β を溶出した。各画分を蒸発乾固したのち、それにエタノール 5 ml を加え、その $\frac{1}{20}$ 量を回収率補正のためのアイソトープの測定に用いた。残りを蒸発乾固し、Roy⁽⁴⁴⁾の方法に従って micro 発色し、

Table 3-1-1. Main steps of the fluorometric method for estimation of estrogen in blood plasma

1. Add 6,7- H^3 -estradiol-17 β to plasma
2. Extract alkaline plasma with ethyl ether (Short⁵⁶)
3. Remove fat by cold centrifugation (Zander & Simmer⁵⁷)
4. Wash ether with alkaline solution
5. Separate phenolic and neutral fractions by partition between benzene - n-hexane and H_2O , 1.6%NaOH
6. Methylate each fraction with dimethyl sulfate
7. Extract each fraction with benzene (estriol) and n-hexane (estrone and estradiol)
8. Separate each fraction by alumina (deactivated with 8% of water) column chromatography
9. Count radioactivity by checking loss in the process
10. Measure each fraction by fluorometry in an Ittrich reaction

Ittrich color の抽出を行なった。アイソトロープの測定には Kobe Kogyo GSL-Type 263 liquid scintillation counter を使用し、蛍光測定には Hitachi spectrofluorometer MPF-2A, あるいは 203 型を使用した。蛍光値は Allen の補正⁵⁷⁾を行なったのち、標準線の読みから estrogen の値を算出した。なお Allen の補正は次の式により行なった。

$$\text{補正蛍光値} = F_{552.5 \text{ nm}} - \left(\frac{F_{530 \text{ nm}} + F_{575 \text{ nm}}}{2} \right)$$

2. progesterone の測定

1). 試薬

抽出あるいは^(薄層クロマトグラフィー)に用いた溶媒はすべて使用前に再蒸留した。回収率補正には 7-3H-progesterone (S.A, 20 C/MM, New England Nuclear Corporation) を用いた。^(薄層クロマトグラフィー)に用いたシリカゲルは GF₂₅₄ (Merck) である。酵素反応に使用

した緩衝液は 0.15 M, pH 5.2, EDTA 添加燐酒酸緩衝液, 0.1 M, pH 8.1 Tris 緩衝液および 0.005 M, pH 8.2, EDTA 添加 Tris 緩衝液である。補酵素として DPNH (Boehringer) を用いた。20 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase (Sigma) は streptomyces dehydrogenans 由来のもので、結晶 1mg と 3.2 M, pH 6.0 の硫酸アンモニウム液 0.5 ml に懸濁した製品である。アイソトープの測定には用いたシンチレーション用 PPO, POPOP およびトリエンを使用した。標準品として用いた progesterone, 20 β -hydroxy-progesterone その他のステロイドはすべて帝國臓器製薬(株)から提供を受けたものである。その他の試薬はすべて特級あるいはステロイド測定用のものを用いた。

2). 実験牛および血液材料

回収率の検討に用いた血液材料は健康な雄牛の頸静脈から採取したものである。progesterone の測定に用いた血液材料は、正常性周期

と示す黒毛和種経産牛4頭から、1性周期の間、連日あるいは隔日に頸静脈から採取(50~1,260 mL)した統計56例である。血液は採取後ただちに室温で遠心分離し、血漿は測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。なお血液の凝固防止剤としてはヘパリンを使用した。

3) progesterone の抽出ならびに測定法

progesterone 測定法の概要を表3-2-1に示した。回収率補正のために、血漿に γ - ^3H -progesterone (12,000 dpm/0.55 ng) ⁵⁶⁾を加え、Shortの方法によつて progesterone と抽出した。Zander & Simmer ⁵⁷⁾の方法で脂質を除去したのち、上清を蒸発乾固し、その残渣をクロロホルムで溶解し、薄層プレート上に滴下し、溶媒組成として n-ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 2 で2回、ベンゼン : 酢酸エチル = 2 : 1 で1回展開した。薄層板上から progesterone 相当部分をかきとり、メタノール 2 mL で3回、1 mL で1

回攪拌遠沈により progesterone を溶出し、蒸発乾固した。20 β -hydroxy-steroid dehydrogenase による progesterone の還元は Molen & Groen の方法⁶⁰⁾に従い、残渣に 1 滴のエタノールを加え、燐酸緩衝液 0.5 ml を添加後、補酵素液 0.03 ml、原液を 10 倍に希釈した 20 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase 液 0.03 ml (6 μ g) と加え、試験管を充分攪拌したのち、37 $^{\circ}$ C で 2 時間感作した。20 β -hydroxy-progesterone の純化は progesterone の分離方法に準じて薄層フロマトグラフィーによつて行なった。溶出液を蒸発乾固したのち、残渣にエタノールを添加し、その $\frac{1}{20}$ 量は回収率補正のためのアイソトープ測定に用いた。残りの溶媒は蒸発乾固し、発色し、蛍光測定に用いた。発色には抽出物に硫酸-エタノール試薬 (60:40) 3.5 ml を加え、60 $^{\circ}$ C、10 分間感作したのち、約 10 分間放置した。蛍光測定は 468 nm で励起し、蛍光波長 525 \pm 25 nm で蛍光値を読み、Allen の補正⁵⁹⁾を行ない、標準線の読みから progesterone 値を算出した。なお溶媒の

Table 3-2-1. Main steps of the fluorometric method for estimation of progesterone in blood plasma

1. Add 7- H^3 -progesterone to the plasma
2. Extract alkaline plasma with ethyl ether (Short⁵⁶)
3. Remove fat by cold centrifugation (Zander & Simmer⁵⁷)
4. Isolate free progesterone by thin layer chromatography
1st system.....n-hexane : ethyl acetate (5:2)
2nd system.....benzene : ethyl acetate (2:1)
5. Reduce progesterone with 20 β -hydroxy-steroid dehydrogenase (Molen & Groen⁶⁰)
6. Purify 20 β -hydroxy-progesterone by thin layer chromatography (solvent system : same as shown in step 4)
7. Count radioactivity to check loss in the process
8. Measure 20 β -hydroxy-progesterone by fluorometry

蒸発乾固はすべて減圧下、あるいは N_2 ガス下で行なった。アイソトープの測定には Kobe Kogyo GSL-263型および Beckman LS-100 型 liquid scintillation counter を使用し、蛍光測定には Hitachi spectrofluorometer MPF-2A, あるいは 203 型を使用した。なお Allen の補正は次式により行なった。

$$\text{補正蛍光値} = F_{525\text{nm}} - \left(\frac{F_{500\text{nm}} + F_{550\text{nm}}}{2} \right)$$

第2節 実験成績

1. estrogen の測定

1). 測定法の検討

a. Ittrich color の蛍光特性

estrone, estradiol- 17β , estriol-methyl ether と Roy⁴⁴⁾の方法に従って発色し、その蛍光特性を検討

した結果，励起光波長 538 nm，蛍光波長 552.5 nm で最大蛍光値が得られた(図 3-1-1)。しかし，この条件では両者のピークが接近しているため，実際に血中 estrogen の測定を行なうにあたっては後述の理由により蛍光強度はむしろが励起光波長を 510~520 nm に選ぶのが良いと考えられた。なおこの蛍光特性は estrone, estradiol-17 β , estriol に共通であった。実際の測定にあたって得られる波長型を一括して図 3-1-2 に示した。

b. 蛍光の安定性

発色体を暗所に放置した際のその蛍光強度は 4°C, 12°C では 3 時間でそれぞれ 95%, 98% であったが，30~33°C では 79% に低下した。4°C から 20°C に温度を上げた場合の蛍光強度は 1 時間で 84% に低下した。この成績から Arrhenius color は高温および温度の急変には不安定であることを認めた。つまり蛍光強度は 20°C において，暗室，直射光のあたらない場

所では数時間安定であるが、実際の明るい所、直射光下では1時間で40%以下に低下した。

C. 感度

estrone, estradiol-17 β , estriol-methyl ether の検量曲線は1ng以上で直線性を示した。発色の程度はestroneが最も強く、estradiol-17 β , estriolの順であった。

2). 性周期に依ける動態

牛血中にはestrone, estradiol-17 β が認められたが、estriolは検出されなかった。性周期の全期間を通じてestradiol-17 β 測定値はestroneにくらべて高いが、両者はほぼ同様に増減した。すなわち2頭の牛の性周期に依ける血中estrogenの消長は発情前期から増加し、排卵前には鋭いピークを示したのち、急激に減少して排卵時には低値となった。さらに黄体期に

Fig.3-1-1.Excitation(I) and emission (II) spectra of estrone-methyl ether

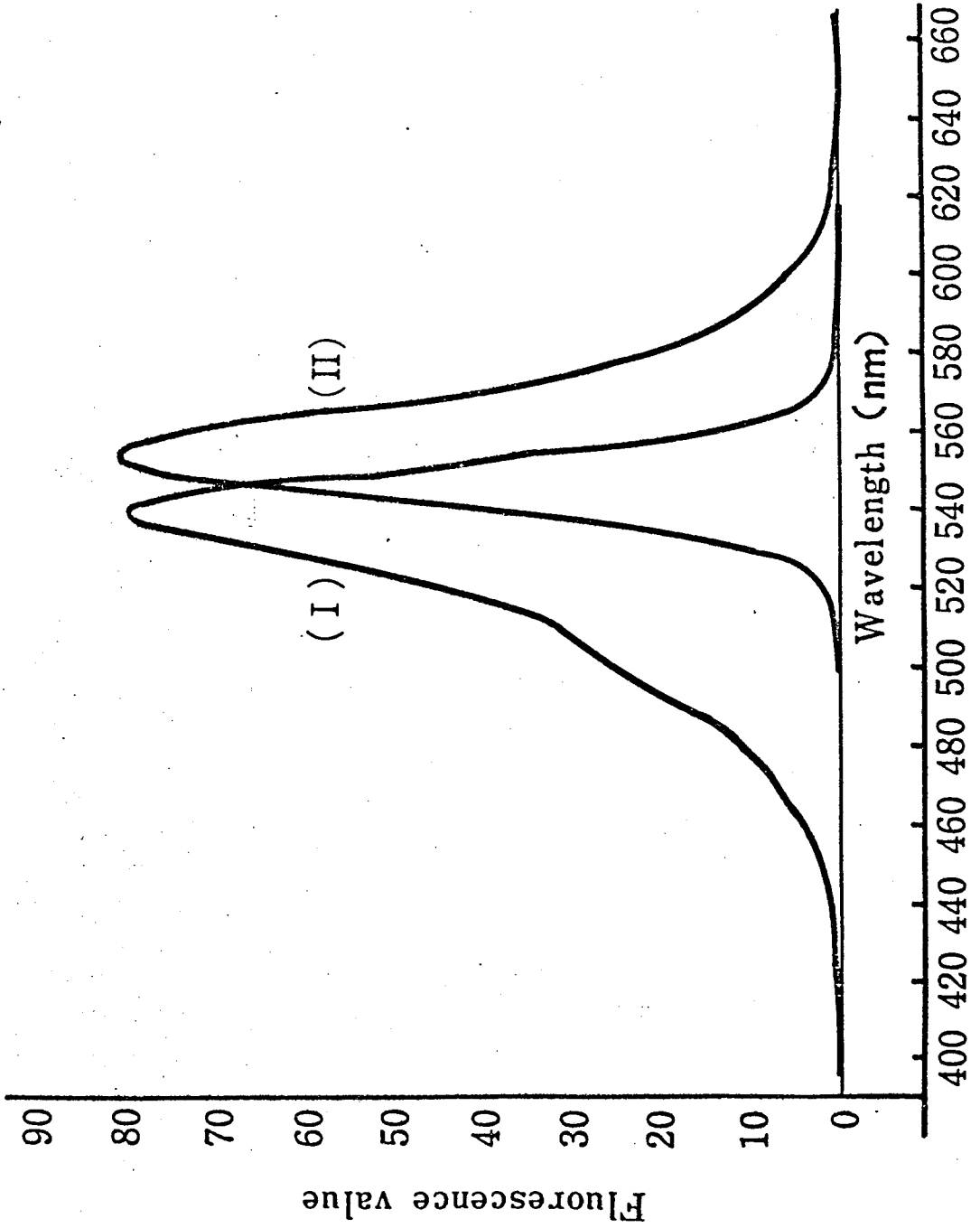


Fig.3-1-2. Fluorescence spectra of estrogen

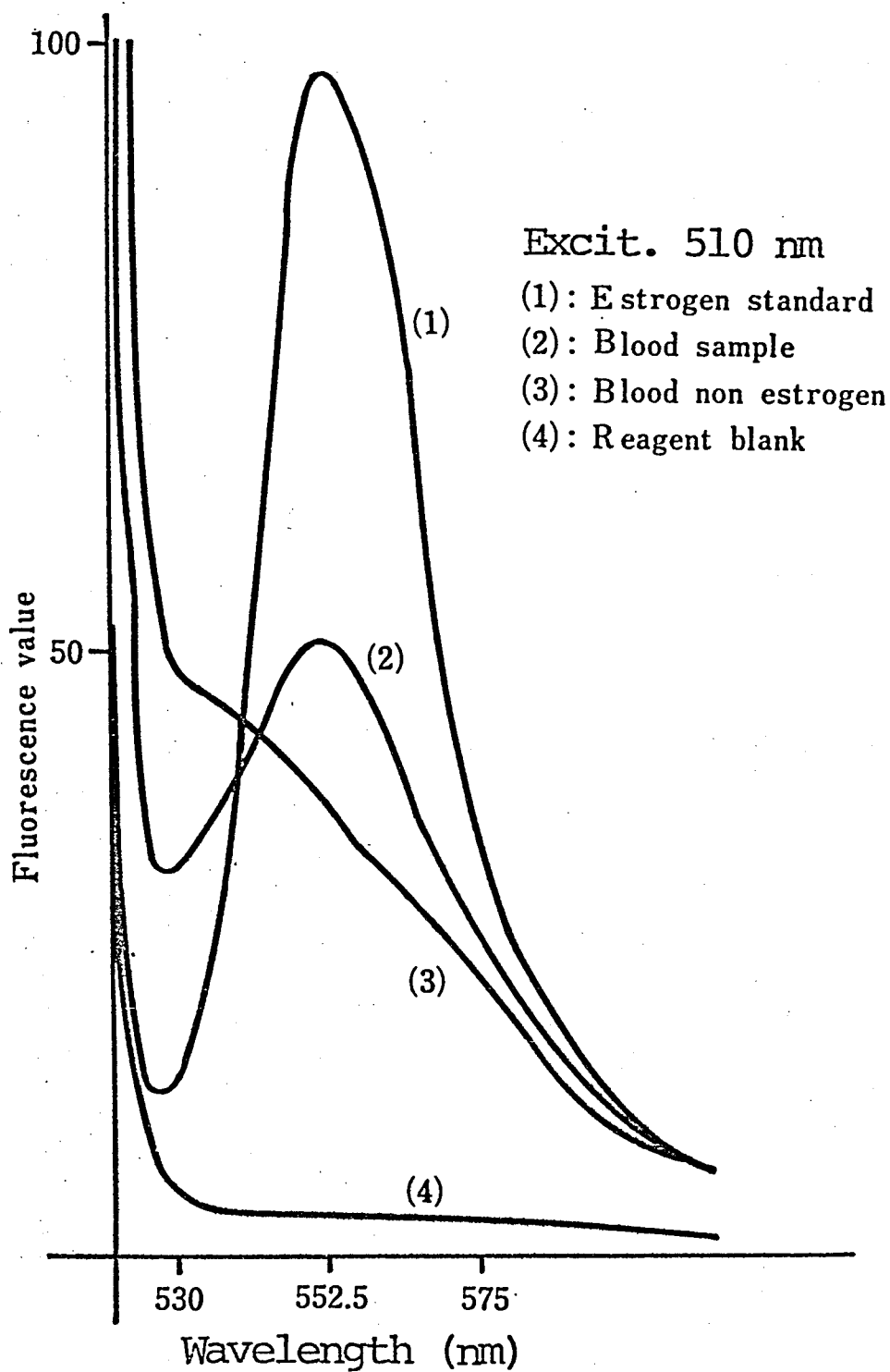


Fig. 3-1-3. Blood estrogen levels in a cow during estrous cycle

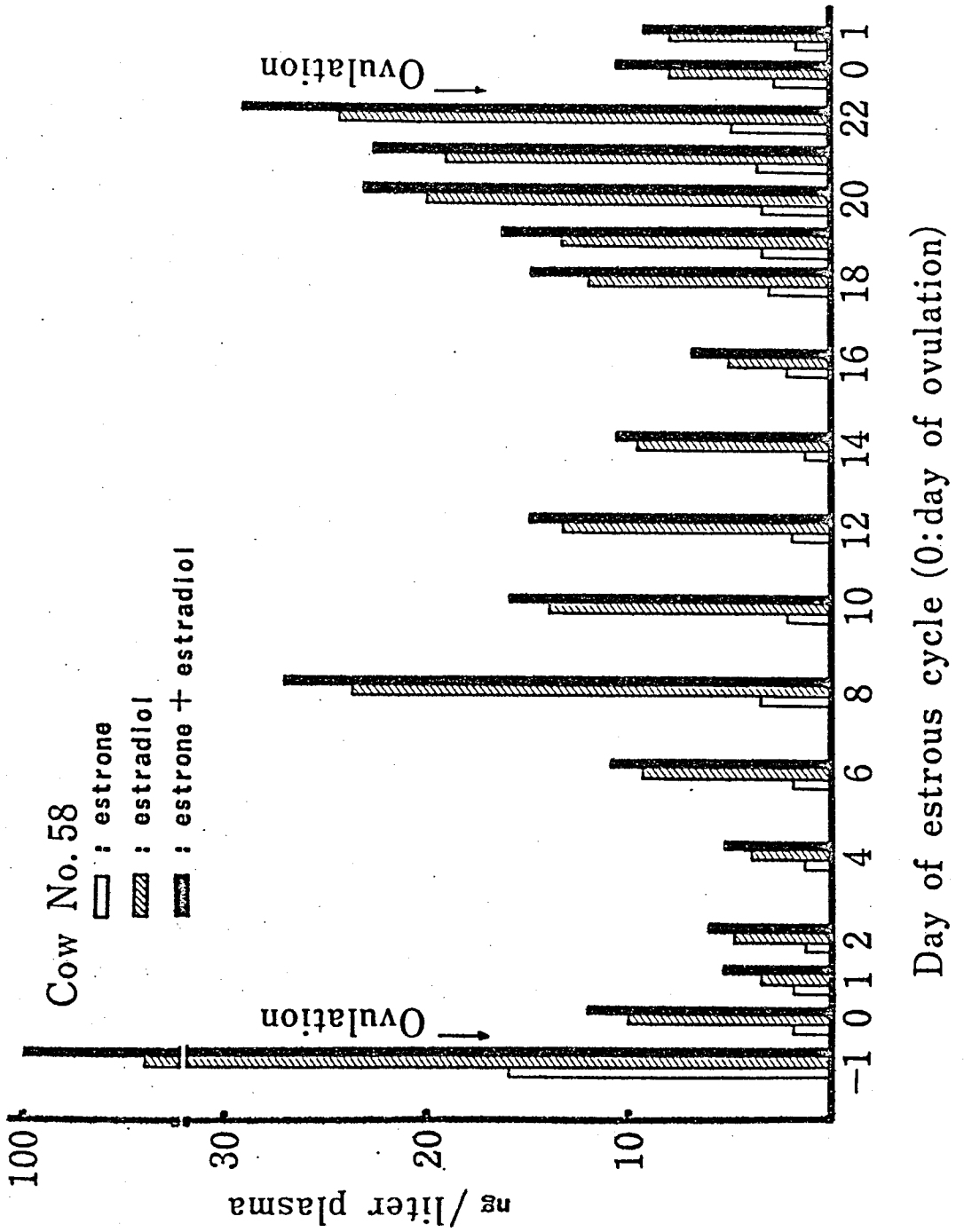
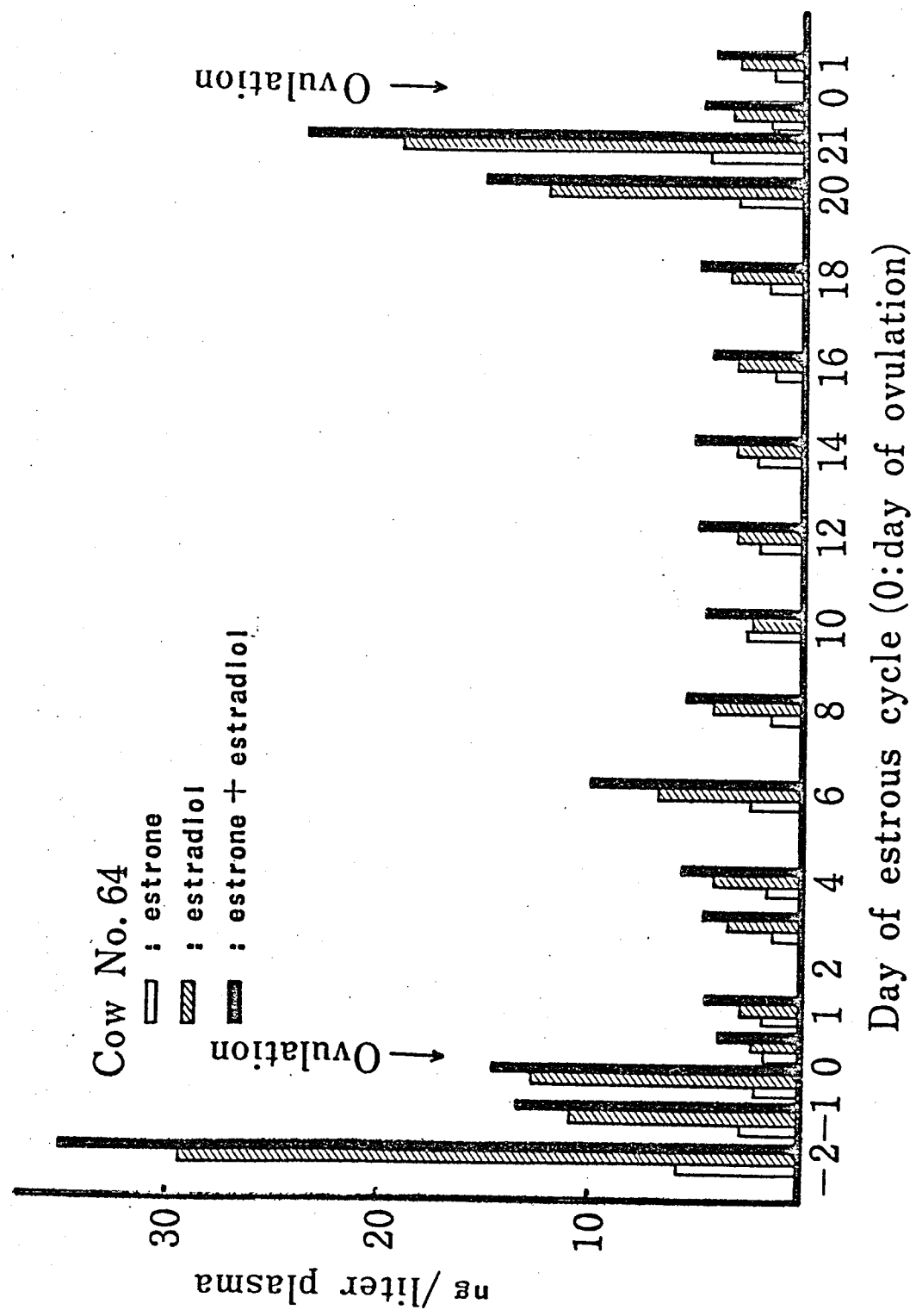


Fig.3-1-4. Blood estrogen levels in a cow during estrous cycle



は6~8日にかけて、再びピークを形成した。結局、一性周期の間にふたつのピークを示すことを認められた。牛 No. 58 (図3-1-3) の排卵前日および黄体期 (排卵後8日) における総 estrogen の最高値はそれぞれ 99.8 ng/L および 27 ng/L 、発情後 (排卵後1日) の最低値は $5.3 \sim 9.2 \text{ ng/L}$ であった。牛 No. 64 (図3-1-4) の排卵前日および黄体期 (排卵後6日) における総 estrogen の最高値はそれぞれ 35.3 ng/L および 10.1 ng/L であり、発情後期 (排卵日) における最低値は 3.8 ng/L で全般に牛 No. 58 にくらべて低い傾向がみられた。また、それぞれの牛において連続した2発情期における血中 estrogen の濃度水準はかなりの差異があることが認められた。

2. progesterone の測定

1). 測定法の検討

a. 薄層クロマトグラフィーの展開溶媒 progesterone, testosterone, androstenedione, 17 α -hydroxyprogesterone および 20 β -hydroxy-progesterone について、それぞれを分離するための展開溶媒の組成を検討した。その結果 n-ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 2 を 2 回, ベンゼン : 酢酸エチル = 2 : 1 を 1 回使用した場合に progesterone とその他のステロイドを明瞭に分離し得た。

b. 20 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase の活性。

progesterone 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μ g の 5 検体にそれぞれ 20 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase 6 μ g を添加して, progesterone から 20 β -hydroxy-progesterone への転換量ならびに転換率を検討した (図 3-2-1)。その結果 progesterone 2.5, 5.0 μ g における転換率は 100%, 10.0 μ g では 87%, 20.0 および 40.0 μ g ではそれぞれ 57% および 29% であった。この成績から 10 μ g 以上の progesterone が存在すると転換率が低下して, 20 β -hydroxy-progesterone は 11 μ g 付近

でほぼプラトーに達することを認めた。

C. 20β -hydroxy-steroid-dehydrogenase の特異性
 progesterone に近縁の 2,3 のステロイド, すなわち testosterone, androstenedione, 17α -hydroxy-progesterone をそれぞれ $20\mu\text{g}$ に 20β -hydroxy-steroid-dehydrogenase $6\mu\text{g}$ を加えて, progesterone と同様の方法で処理して薄層クロマトグラフィーを行なった。その結果, 本酵素は progesterone だけに特異性をもつものであることを認めた。

d. 蛍光発色条件の検討

20β -hydroxy-progesterone に対する発色試薬としての硫酸エタノール比ならびに加温時間が蛍光強度に及ぼす影響, および発色後の蛍光の安定性を検討した。なお加温温度は Heap の原法⁴⁵⁾により 60°C とした。

硫酸-エタノールの比率 : 濃硫酸に対するエタノールの容量百分率 20, 30, 35, 40, 45, 50% について検討した。その結果, 濃硫酸に 40

%の割合でエタノールを加えた試薬が最も強い蛍光強度を示した(図3-2-2)

加温時間 : 発色試薬として原法の濃硫酸-80% エタノール(2:1)ならびに濃硫酸-エタノール(3:2)の2種を用い、加温時間を1~45分の範囲で蛍光強度を検討した。その結果、原法では30分の加温で最も強く発色したが、濃硫酸-エタノール(3:2)では10分で最高値を示し、かつ原法に比べて高い蛍光値が得られた。

加温々度 : 上述の実験で得られた至適の硫酸-エタノール比(3:2), ならびに加温時間10分で、加温々度を40~70°Cの範囲で検討したところ、蛍光強度は60%でプラトーに達することを知り得た。

蛍光の安定性 : 原法および本法について発色後室温(20°C)で直射光をさけて放置した場合の蛍光強度の低下を検討した。その結果発色時の蛍光強度を100%とすると、原法では1時間後に93%, 2時間後に82%, 3時間

後に76%に低下していた。これに対して本報では2時間後に94%、3時間後に88%で原法にくらべて蛍光の安定性がやや高いことを認めた。

e. 蛍光特性

20 β -hydroxy-progesterone 2 μ g を変法により発色させ、その蛍光特性を検討した結果、励起光波長468 nm、蛍光波長525 nmで最大蛍光値が得られた(図3-2-3)。

f. シリカゲル盲検値

抽出物の精製に用いた溶媒で展開した薄層板から、シリカゲルをかきとり、これを攪拌遠沈して得られた溶出物の盲検値は、20 β -hydroxy-progesterone 2.60 ± 1.31 ng に相当する値であった。なお試薬盲検値は 0.86 ± 0.47 ng であった。

g. 感度

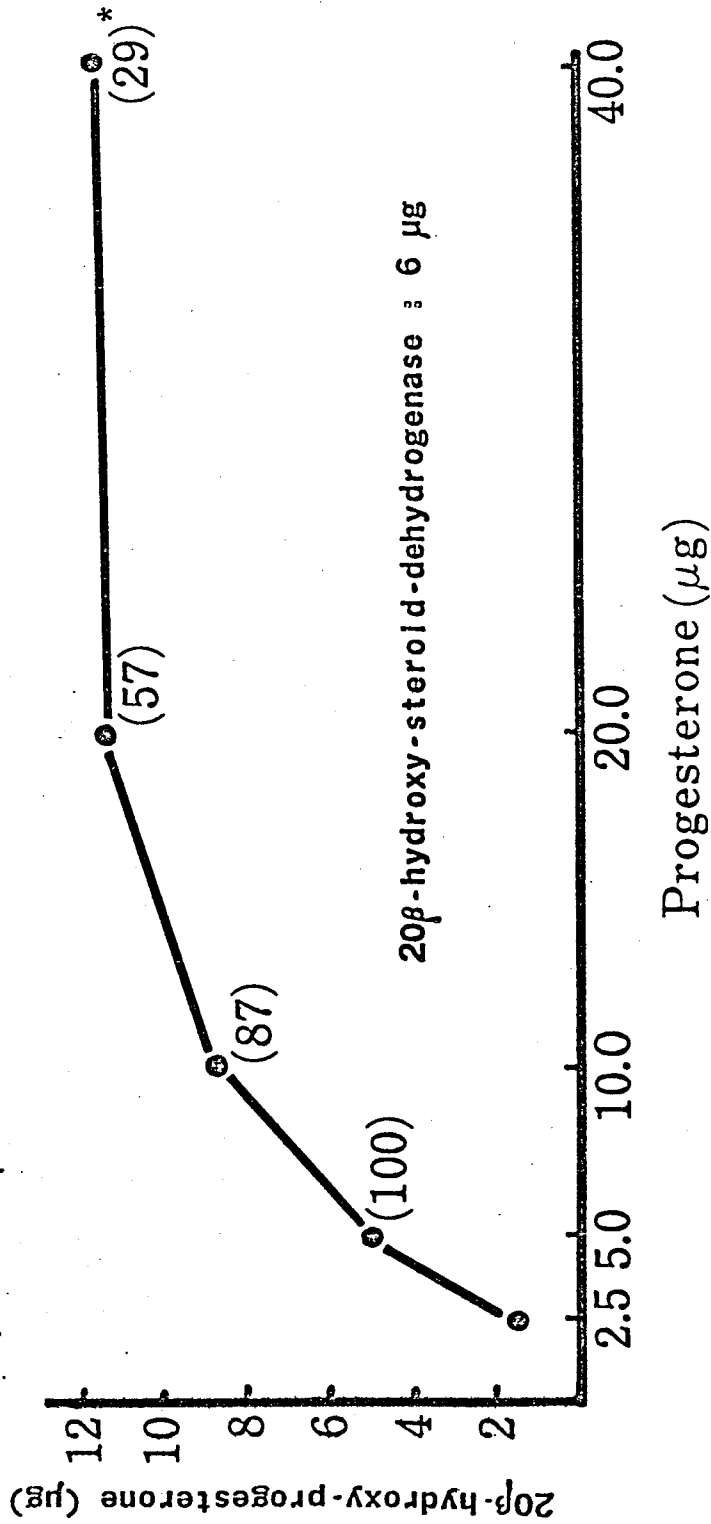
変法の発色条件により2.5~20.0 ngの範囲で

検量線を求めると、その間で直線性が得られた。

2) 性周期における動態

黒毛和種経産牛4頭の性周期における progesterone の消長を検討した成績を図3-2-4に示した。progesterone は発情期に最低値 $0.2 \sim 0.8$ ng/ml, 黄体期(排卵後8~20日)に最高値 $2.6 \sim 6.2$ ng/ml を示し, 次の排卵前3~5日から急激に低下することを認められた。なお各個体ごとの血中 progesterone の濃度水準ならびに消長はかなり差異があることが認められた。すなわち progesterone 値がピークを形成する時期は早いものでは排卵後8日, 遅いものでは21日であり, 従って, 減少を開始する時期は個体によりかなり異なることが認められた。

Fig.3-2-1. Conversion of progesterone to 20 β -hydroxy-progesterone
by 6 μ g of 20 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase



* In parenthesis is shown the conversion rate

Fig.3-2-2. Effect of ratio of sulfuric acid to ethanol (v/v%)
on fluorescence value

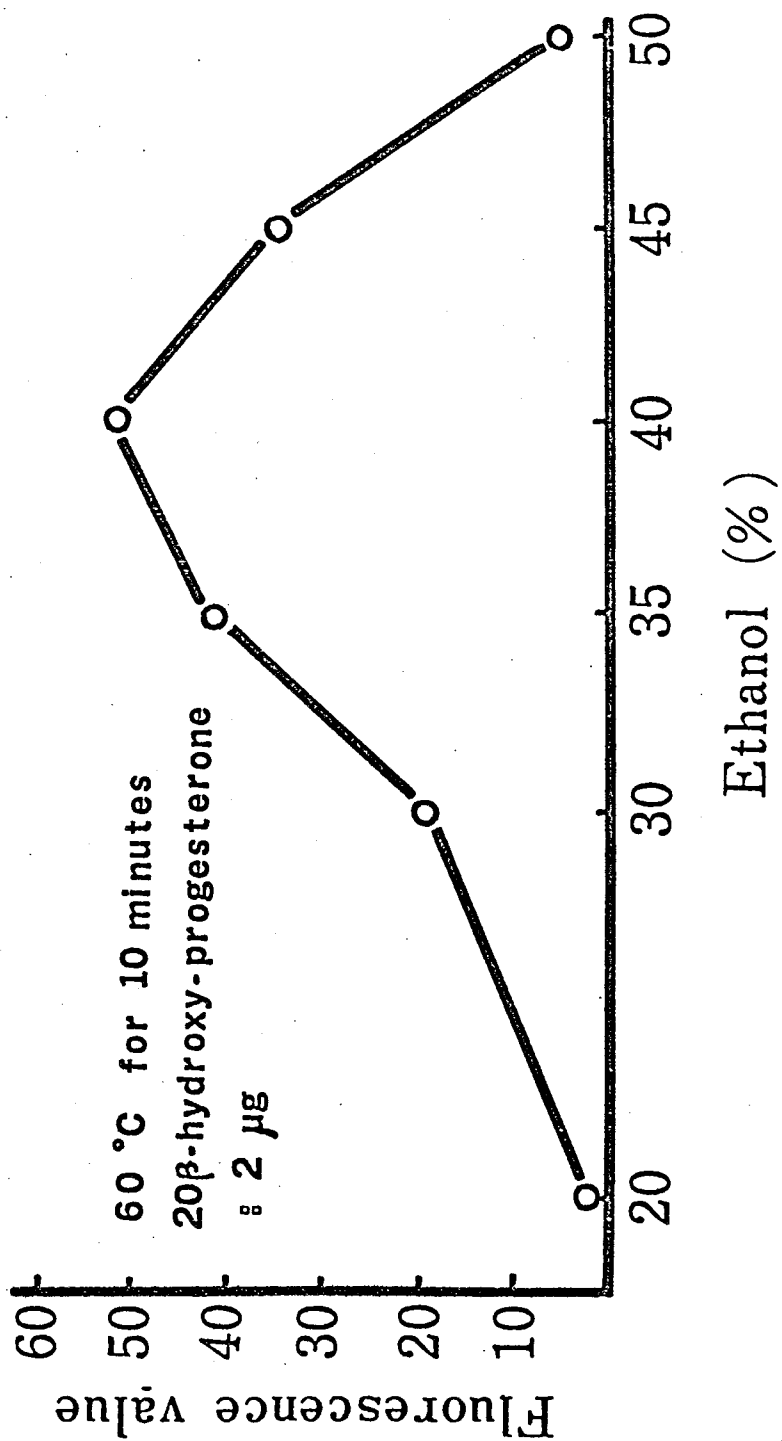


Fig.3-2-3. Excitation (I) and emission (II) spectra of 20 β -hydroxyprogesterone

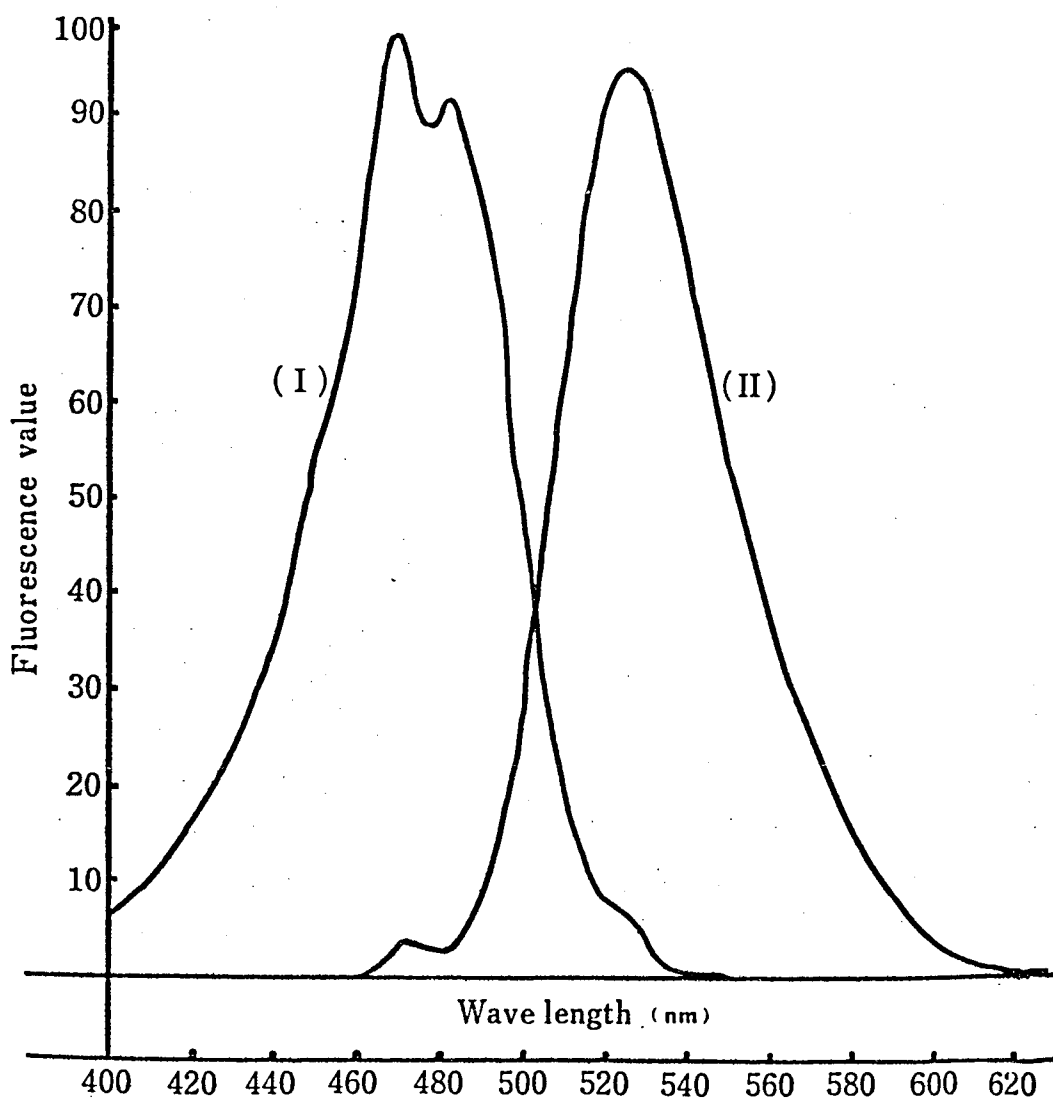
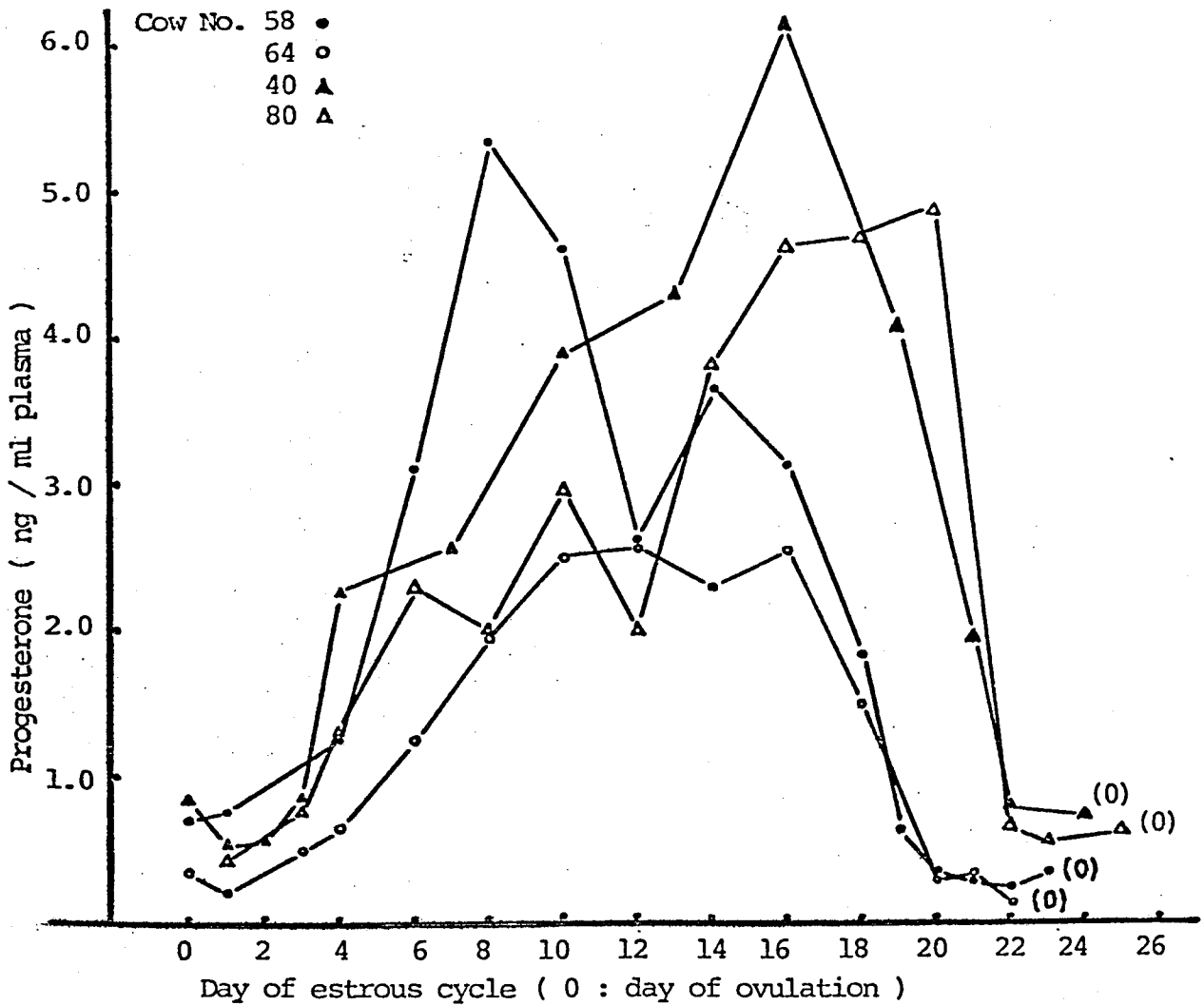


Fig.3-2-4. Concentration of plasma progesterone of four cows during the estrous cycle



第3節 考 按

1. estrogen の測定

1) 測定法について

estrogenの生体内に於ける作用機軸および代謝機構を解明するためには微量の estrogen 含量を測定する必要がある。近年、アイソトロープとトレーサーとして応用した測定法が急速に進歩してゐる。本実験では estrogen 測定法として特異性、感度ともに優れてゐる Ittrich 蛍光法と応用した。Ittrich color の測定に Roy⁴⁴⁾ は干渉フィルターを用いてゐるが、本実験では連続的な波長型が得られるキセノンランプを使用した。Ittrich 蛍光法には蛍光を抽出するための試薬として p-ニトロフェノールを添加したクロロホルム、テトラクロルエタン、テトラクロルメタンなども用ゐるが、Scholler⁶¹⁾によればこの三種の溶媒による励起光

、蛍光最大波長は少しずつ異なると思われる。本実験ではテトラクロルエタンを使用して励起、蛍光最大波長、それぞれ 538 nm 、 552.5 nm を得た。大量の血液から estrogen を抽出する場合には精製を重ねても不純蛍光による影響が大きいと推測される。このような場合には通常 Allen の補正が行なわれている。しかし上述の条件では両波長のピークが近接しているため散乱光のため補正の意味がなくなる。従って血中 estrogen の測定には感度は若干低下するが、より正確な値を得るために本実験では励起波長 $510 \sim 520 \text{ nm}$ を選んだ。

Ittrich 試薬として p-ニトロフェノールテトラクロルエタンを用いた場合、比較的蛍光が安定しているといわれている。本実験に比しては Ittrich color は直射光の照射を避け、温度の急変に注意すれば数時間安定であることも認められた。また estrone, estradiol- 17β , estriol それぞれの発色強度は Brown, Roy ⁽⁴¹⁾ が示しているように estrone が最も強く、estradiol- 17β , est-

iol の順であった。回収率補正のために加えた $6,7-^3\text{H}-\text{estradiol}-17\beta$ の全過程に比ける回収率は平均 $60.3 \pm 11.7\%$ で Roy⁴⁴⁾ の $63 \pm 8\%$ とほぼ一致する結果が得られた。

2) 血中動態について

本実験において牛の性周期に比ける estrogen 値は発情期に鋭いピークを、黄体期にゆるやかなピークを形成することを認めた。化学的測定法により牛の性周期に比ける estrogen の消長を調べた成績は Varman⁵⁴⁾ ら、Mason⁵⁵⁾ らが血液、Mellin & Erb⁶²⁾ が尿について検討した報告がある。Varman⁵⁴⁾ らは血中 estrogen は性周期の 6~8 日および 14~16 日の黄体期にふたつのピークを形成すると述べている。しかし Mason⁵⁵⁾ ら、および Mellin & Erb⁶²⁾ はこのピーク形成は発情期および黄体期にそれぞれひとつであることを認めている。従って本実験で得られた成績は Mason⁵⁵⁾ ら、

Mellin & Erb⁶²⁾ の尿中のそれとほぼ一致していた。またこの成績は第二章において生物学的測定法によつて示された性周期における血中 estrogen の動態とよく一致している。しかしこの estrogen の濃度水準ならびに動態は個体によりかなり異なることが認められた。とくに発情期には同一個体の前後2回の発情期において, estrogen の濃度水準だけでなくその血中持続期間が著しく異なることが注目された。なお Mason⁵⁵⁾ らの報告における estrogen 測定値は著者らの成績にくらべて約 20~100 倍も高く, かつ estrone が estradiol-17 β よりも優位であることが認められたが, この理由については明らかでない。本実験では estrogen を分画測定した結果, 性周期の全期間を通じて estradiol-17 β は estrone にくらべて常に高値を示したが, 両者はほぼ同様に増減することが認められた。この結果は Short^{63,64)} が卵胞液中の estrogen を分画測定した成績とも一致するものであり, 性周期における血中 estrogen は est-

radiol- 17β が主役をなしていることを示唆するものと考えられる。

2. progesterone の測定

1). 測定法について.

progesterone には特異的な呈色反応がないので、化学的測定にあたっては常にその特異性が問題になる。また抽出にあたり、progesterone の精製を繰り返して行ない純度を高めれば、回収率が低下するので、感度の低い呈色反応では測定が不可能にならざるを得ない。このような理由から従来、濃度が比較的低い牛の血中 progesterone を化学的に測定することは容易でなかった。しかし近年測定法の急速な進歩に伴い、体液中の progesterone の測定はかたし容易になりつつある。従先測定法⁶⁵⁾については、Touchstone & Murawec 法⁶⁵⁾などがあるが

ペーパークロマトによる盲検値が高く、かつ特異性が低いことなから利用されていない。この点、 20β -hydroxy-steroid-dehydrogenase により progesterone と 20β -hydroxy-progesterone⁴⁵⁾ に転換して測定する Heap の法は感度、特異性ともに優れたものとして注目されている。

Heap⁴⁵⁾ は progesterone の分離精製にペーパークロマトを用いている。この方法は手技がやや複雑で展開時間が長い難点がある。本実験では操作が簡単で、かつ展開時間が短い薄層クロマトグラフィーをこの代りに導入した。その結果 progesterone および 20β -hydroxy-progesterone の分離精製に満足し得る結果が得られた。本法で得たシリカゲル盲検値は 3.9 ± 0.1 ng⁴⁵⁾ であった。この値は原法のペーパー盲検値とほぼ同様であった。 20β -hydroxy-steroid-dehydrogenase は progesterone と 20β -hydroxy-progesterone に転換するが近縁のステロイドに対しては反応しなかった。このことから、本酵素は progesterone に対して特異的に反応することを認めた。

本実験では、発色の処置を簡易化するために発色試薬である濃硫酸とエタノールの比率を3:2として、 60°C 、10分間加温すると最もよい結果が得られることを認めた。この場合の蛍光の安定性ならびに蛍光強度は原法⁴⁵⁾にくらべて優っていた。Heap⁴⁵⁾は蛍光測定に水銀ランプを用いているが、本実験ではキセノンランプを使用し、励起光 468 nm 、蛍光波長 $525 \pm 25\text{ nm}$ で蛍光値を読み、Allenにより補正蛍光値を求めた。この点、連続的な波長型が得られるキセノンランプは水銀ランプより有利であった。感度は原法⁴⁵⁾とほぼ同じであったが micro cell の応用によりさらに向上させ得るものと考える。

2). 血中動態について

性周期における牛末梢血中 progesterone の化学的測定については紫外部測定法による Gomes⁶⁶⁾の報告がみられるだけである。本実験にお

いて中の性周期における progesterone 値は発情期に最低値、排卵後 8 ~ 20 日の黄体期に最高値を示し、次の排卵前 3 ~ 5 日から急激に低下することを認めたと。この progesterone 測定値は Gomes らの示している値より全般に低かったが、性周期におけるその消長は両者ほぼ一致することを認めた。またこの progesterone の消長は Gomes ら⁶⁶⁾、Erb & Stomshak⁶⁷⁾、Mare ら⁶⁸⁾、Staple & Hansel⁶⁹⁾、Cupps らが示している性周期の各時期における卵巣組織中の gestagen 含有量、あるいは Dobrowolski らが示している卵巣静脈血中 progesterone 値の周期的変化とよく一致していた。このことは末梢血中 progesterone が黄体由来であることを示すものである。本実験の結果は第二章における生物学的測定法による gestagen の動態と黄体期に比してはよく一致していたが、発情期に比しては異なっていた。すなわち化学的測定法によつては発情期における progesterone のピークはみられなかった。また Kazama らはガスクロマトグラフ⁷²⁾

法により発情開始から排卵まで6時間²⁴に採取した血液材料について progesterone を測定し、この時期における progesterone 濃度が低いことを報告している。このことは生物学的測定法により存在が確認された発情期の gestagen の本態を推測する上できわめて興味あることである。

第4節 小 括

牛体液中の estrogen, progesterone を測定する目的で、それぞれ Ittrich 蛍光法, Heap の蛍光法の測定条件に若干検討を加え、これにより性周期における末梢血中 estrogen ならびに progesterone を分画測定し、次の成績を得た。

1. 牛血中 estrogen の測定に Ittrich 蛍光法を応用して、分光蛍光光度計日立 MPF-2A による 203 型を使用して測定した結果、Ittrich

colorの最大波長は励起光 538 nm, 蛍光 552.5 nm
 で, この蛍光特性は estrone, estradiol-17 β およ
 び estriol にそれぞれ共通であることを認めた
 。

2. 実際の estrogen 測定では最大波長が接
 近してゐるので, 感度は若干低下するが 510
 ~ 520 nm で励起し, 蛍光 552.5 \pm 22.5 nm の値
 を読み, Allen の補正を行なった結果, この
 条件において estrone, estradiol-17 β および est-
 riol-methyl ether の最少検出量は 1 ng であった
 。なお回収率補正の目的で加えた 6,7-³H-est-
 radiol-17 β の全過程における回収率は平均
 60.3 \pm 11.7% であった。

3. 正常性周期を示す黒毛和種経産牛2頭
 の頸静脈血について estrogen を分画測定した
 結果, 両牛とも estrone, estradiol-17 β の各消長は
 性周期の全期間を通じてほぼ同じ傾向を示し
 たが, estradiol-17 β は estrone にくらべて全般

に高値であった。また estrinol は検出されなかった。

4. これらの牛の総 estrogen は発情前期に増加し、排卵前には鋭いピーク (13.7 ~ 99.8 ng/L) を形成し、排卵後は急激に減少して最低値 (3.8 ~ 5.3 ng/L) を示した。黄体期の最高値 (10.1 および 27.0 ng/L) は排卵後 6 ~ 8 日に認められた。すなわち estrogen の血中濃度は性周期の間に 3 つのピークを形成することと認められた。なお、それぞれ別の牛において連続した 2 発情期における血中 estrogen の濃度水準はかなりの差異があることが認められた。

5. progesterone と 20 β -hydroxy-progesterone の分離精製に薄層クロマトグラフィーを応用し、溶媒として n-ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 2 を用いて 2 回、ベンゼン : 酢酸エチル = 2 : 1 を用いて 1 回展周して、良い結果が得られた。

6. 20β -hydroxy-steroid dehydrogenase $6 \mu\text{g}$ は progesterone $5 \mu\text{g}$ と 100% , $10 \mu\text{g}$ と 87% , 20β -hydroxy-progesterone に転換することを認めた。

7. 蛍光強度は濃硫酸 : エタノール = 3 : 2, 10分, 60°C で最も強く, かつ蛍光は安定で, 本蛍光の最大波長と蛍光分光光度計日立MPF-2A および203型で測定した結果, 励起光は 468 nm , 蛍光は 525 nm でこの条件において 20β -hydroxy-progesterone の最少検出量は 2.5 ng であった。

8. 黒毛和種経産牛4頭の性周期における頸静脈血中 progesterone の消長は個体によりかなり異なっているが, 全体の傾向としては発情期に最低値 ($0.2 \sim 0.8 \text{ ng/ml}$), 排卵後8~20日の黄体期に最高値 ($2.6 \sim 6.2 \text{ ng/ml}$) を示し, 次の排卵前3~5日から急激に低下することを認めた。

第4章 性周期における牛末梢血中estrogen, progesterone, 17 α -hydroxy-progesterone および 20 β -hydroxy-progesterone の動態
—とくに radioimmunoassay 法による検討—

緒言

第2章では生物学的的方法, 第3章では化学的方法により牛血中 estrogen および gestagen を測定したが, これらの方法は感度, 精度, 操作などの諸点で問題が多く, 一般に広く応用することは困難であるように思われた。ところが1969年⁴⁷⁾ estradiol-17 β の radioimmunoassay 法が試みられて以来, 本法は操作が比較的容易で, かつ精度ならびに感度が高いため各種家畜の体液中性ステロイドの測定に用いられるようになってきた。

本章では estrogen, progesterone, 17 α -hydroxy-progesterone ならびに 20 β -hydroxy-progesterone について, それぞれの家兎抗血清を使用した radioimmu-

noassay 法について若干検討を加え、さらに件の性周期における末梢血中のこの性ステロイドの消長を追求した成績について述べる。

第1節 実験材料ならびに方法

1. estrogen の測定

1). 試薬および器具

回収率の補正ならびに測定に使用した放射性 estrogen は estrone-6,7- ^3H (比放射能 40 Ci/mM, NEN), estradiol-17 β -6,7- ^3H (比放射能 40 Ci/mM, RCC), estriol-6,7- ^3H (比放射能 42.2 Ci/mM, NEN) である。非放射性 estrogen ならびに交叉反応の検討に用いた他のステロイドはすべて帝國臓器製薬(株)より提供も受けたものである。estrogen の分離精製には Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) のミクロカラムフロ

マトグラフィーを用いた。

抗血清の希釈は 0.05 M 硼酸緩衝液 (pH=8.0) に牛血清アルブミン (Nutritional Biochemical Corporation) を 0.06% , 牛γ-グロブリンを 0.05% の割合に溶解したものを使用した。また結合型および遊離型 estrogen の分離には 50% (w/v) 硫酸アンモニウム溶液を使用した。

シンチレーターはジオキサン (ジオキサン 1,000 ml に POPOP 250 mg, PPO 10g, ナフタリン 100g を溶解) ならびにトルエン (トルエン 1,000 ml に POPOP 100 mg, PPO 4g を溶解) を使用した。アイソトープの測定は Beckman LS-230 型ならびに Intertechnique SL-30 liquid scintillation system で行なった。

溶媒はすべて試薬一級を再蒸留したもので、
 あまいは試薬特級、クロマト用あまいはシンチレーション用を使用した。

ガラス器具は予備洗浄後、フローム硫酸混液に一夜以上浸漬し、水洗を繰り返したのち、使用直前さらにメタノールにより洗浄した。

2). 抗原の合成および抗血清の作成

抗原とした estrogen 蛋白結合物 estrogen-oxime-
 牛血清^(アルブミン)は estrogen の oxo 基を利用して oxime 誘導体
 を作成し, これに牛血清アルブミンと結合し
 て合成したものである。抗血清は estrone-17-
 oxime-牛血清アルブミン, estradiol-17 β -6-oxime
 -牛血清アルブミンおよび estriol-6-oxime 牛
 血清アルブミンそれぞれ 1mg と Complete Freund's
 Adjuvant 0.5 ml, 生理食塩液 0.5 ml の混合液に
 加え, この乳化液を 1 回量としてそれぞれ成
 熟家兎の背部皮下に注射して作成した。抗原
 の注射は最初の月は 2 回, 2 カ月以降は月 1
 回行ない, 本実験に使用した抗血清は注射開
 始後 8 カ目に採取したものである。

3). 測定法

牛血清中 estrogen の抽出, 分離精製および radio-
 immunoassay 法は牧野⁽⁷³⁾の方法に準じて行なった

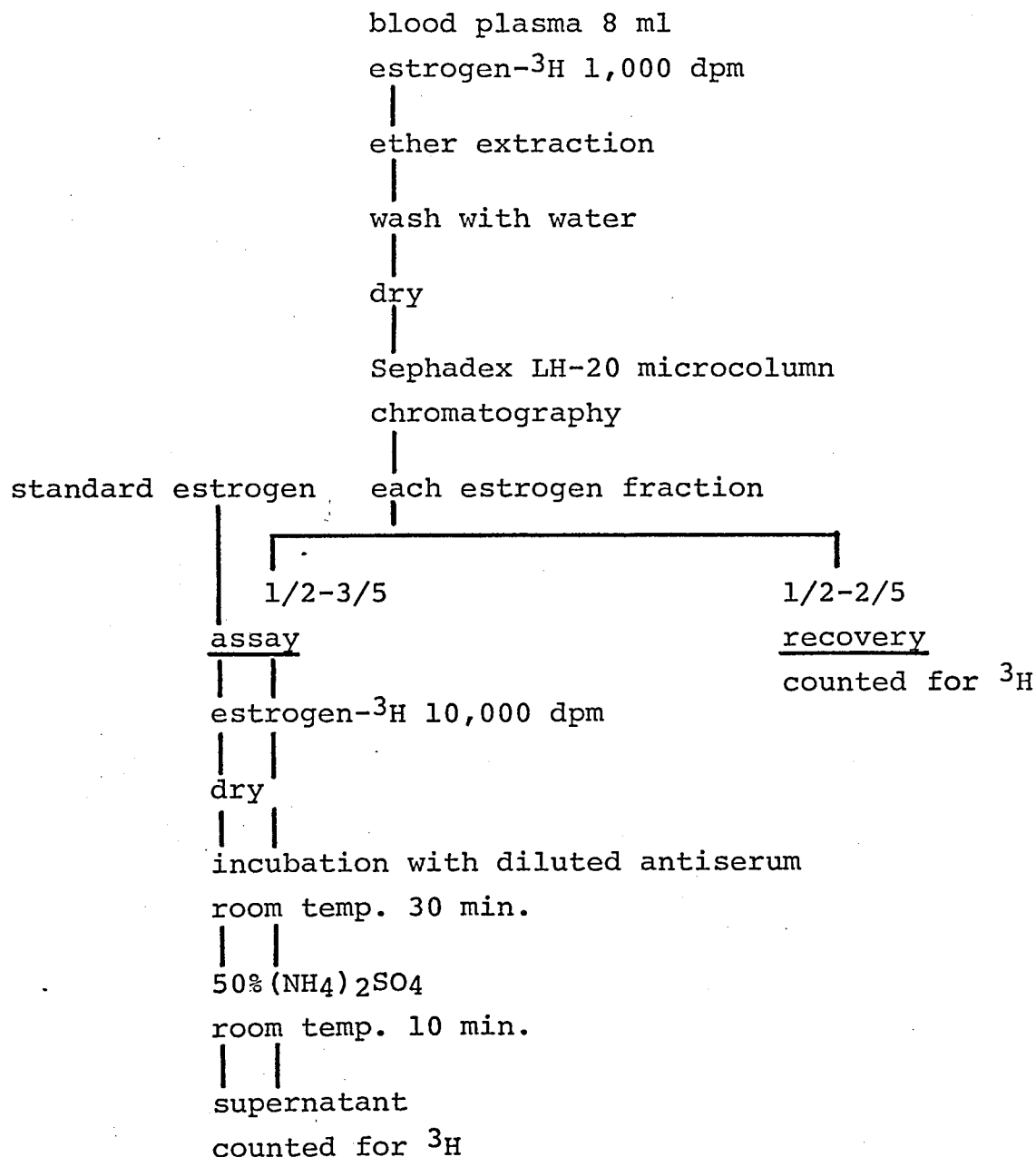
。その概要を図4-1-1に示した。

a. 抽出, 分離精製 : 回収率を求めるために遠心沈澱管にあらかじめ 10^3 dpm の estrone, estradiol- 17β および estriol- $3H$ をそれぞれ加えて乾固させ, 여기에被検血漿 8 ml を加え, その5倍量のエーテルで抽出を1回行ない, 下層を捨て水を加えて水洗したのち, エーテル層を他のフラスコに移し, 減圧下で蒸発乾固させた。

estrogenの分離精製は Sephadex LH-20 を用いたミクロカラムクロマトグラフィーにより行なった。すなわちベンゼン : メタノール (85 : 15) で一夜膨潤させた Sephadex LH-20 をカラム (2 ml のツベルリン注射筒) につめ, 溶媒を 5 ml 以上流してベットの安定させたのち, 抽出物をカラムにのせ, estrone, estradiol- 17β , estriol 各画分を分取した (図4-1-2)。

b. radioimmunoassay 法 : 溶出液と N_2 ガス

Fig. 4-1-1. The procedure of estrogen radioimmunoassay



下で乾固させたのち、一定量のメタノールを加え、その $\frac{1}{2}$ 量あるいは $\frac{3}{5}$ 量は回収率測定用とし、残りを estrogen 測定に用いた。まず、それぞれ estrogen 画分に 10^4 dpm の estrogen- $3H$ を加え、 $60^\circ C$ 以下、 N_2 ガス下で乾固した。ついで適正希釈した抗血清 0.25 ml を加え、充分振盪したのち、室温で 30 分感作した。結合型および遊離型 estrogen- $3H$ の分離には硫酸塩析法を用いた。すなわち 50% 硫酸アンモニウム液 0.25 ml を加え、よく混和し、室温で 10 分間放置したのち、 $3,000$ rpm、10 分間遠沈し、結合型を沈澱させた。その上層 0.2 ml をカウンティングバイアルにとり、ジオキサンシンチレーター - 10 ml を加えて liquid scintillation counter で放射能を測定した。計数值から estrogen- $3H$ の結合率 (% bound) を求め、標準曲線から estrogen 量を算出した。

c. 結合率ならびに測定値の算出法：次式により結合率ならびに血漿 1 ml 中の estrogen

濃度を算定した。

$$\text{結合率 Bound(\%)} = \frac{1}{T} \left(T - \frac{0.5}{0.2} F \right) \times 100$$

T : 加えた標識ホルモンの放射能 (dpm)

F : 上清 0.2 ml の放射能 (dpm)

血漿 1 ml 中の estrogen 濃度 (pg/ml)

$$= (M - W) \times \frac{100}{R} \times 2 \times \frac{1}{V}$$

M : 標準曲線から得た検体の読み (pg)

W : 水ブランク値 (pg)

R : 回収率 (%)

V : 被検血漿量

4). 実験牛および血液材料

供試牛はそれぞれ経産牛で黒毛和牛 2 頭, ジャージー種 2 頭およびホルスタイン種 1 頭を含む 5 頭である。なお 1 頭の牛に 7 回 2 回

2 性周期にわたり採集した。血液材料は頸静脈から採取したヘパリン血統計 101 例で採取後血漿を直ちに分離して、測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。

2. progesterone の測定

1) 試薬および器具

回収率の補正ならびに測定に使用した放射性 progesterone, progesterone $1\alpha, 2\beta\text{-}^3\text{H}$ は Radiochemical Center の製品で, specific activity が 53 Ci/mM のものである。非放射性 progesterone ならびに他のステロイドはすべて帝国臓器製薬(株)から提供を受けたものである。progesterone の分離, 精製には Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) を用いた。

採血槽の希釈液は 0.05 M 硼酸緩衝液 ($\text{pH } 8.0$) に牛血清アルブミン (Nutritional Biochemical Cor-

poration) を 0.06%, 牛乳-ゲロブリン (Nutritional Biochemical Corporation) を 0.05% の割合に溶解したものを使用した。また結合型 progesterone- ^3H 及び遊離型 progesterone- ^3H の分離には 50% (w/v) 硫酸アンモニウム溶液を使用した。

シンチレーターはジオキサン (POPOP 250 mg, PPO 10g, ナフタリン 100g とジオキサン 1,000 ml に溶解) ならびにトルエン (POPOP 100 mg, PPO 4g, トルエン 1,000 ml に溶解) を使用した。アイソトープの測定は Beckman LS-230 型 liquid scintillation system で行なった。溶媒は全て試薬特級, フロマト用あるいはシンチレーション用, 蒸留水は再蒸留したものを使用した。なお本実験に使用したガラス器具は全て予備洗浄後フロム酸混液に一夜以上浸漬し, 石けん洗浄, 水洗を繰り返し, その後蒸留水, アルコールを通し, 自然乾燥させ, さらに使用前にメタノールにより洗浄した。

2) progesterone-3-oxime - 牛血清アルブミンの合成および抗血清

抗原とした progesterone 蛋白結合物 progesterone-3-oxime - 牛血清アルブミンは progesterone の oxo 基を利用して oxime 誘導体を作成し、これに牛血清アルブミンを結合して合成したものである。抗血清は progesterone-3-oxime - 牛血清アルブミン 1 mg を complete Freund's adjuvant 0.5 ml / 生理食塩液 0.5 ml の混合液に加え、この乳化液を 1 回量として成熟家兎の背部皮下に注射して作成した。抗原の注射は最初の月は 2 回、2 カ月以降は月 1 回行ない、本実験に使用した抗血清は注射開始後 8 カ月目に採取したものである。

3) 測定法

牛血清 progesterone の抽出、分離精製および radioimmunoassay 法は牧野¹³⁾の方法に準じて行なつ

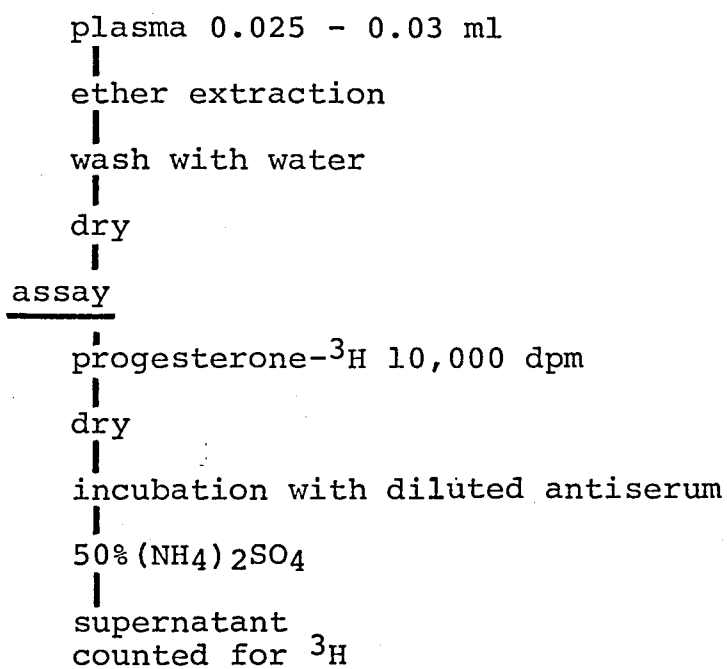
た。その概要を図4-2-1に示した。

a. 抽出, 分離精製 : 回収率を求めると
めに, スポットグラスに, あらかじめ 10^3
dpm の progesterone- ^3H を加えて乾固させ, こ
れに被検血漿を加え, その10倍量のエーテル
で1回抽出を行なった。その後下層を捨てた後
エーテル層に血漿と同量の蒸留水を加えて振
盪, 軽く遠心分離し, エーテル層を他のスピ
ットグラスに移し, N_2 ガス下で蒸発乾固させた。

progesterone の分離精製は Sephadex LH-20 を用
いたミクロカラムクロマトグラフィーにより
行なった。すなわちベンゼン : メタノール
(85 : 15) で一夜膨潤させた Sephadex LH-20 を
2 ml のツベルリン注射筒に詰め溶媒でベッ
トを安定させた後, 抽出物をカラムにのせた。
本法による progesterone の溶出部位は 1.0~1.4
ml の範囲で大部分が回収された。

b. radioimmunoassay 法 : 溶出液を N_2 ガス下
で乾固させたのち, 一定量のメタノールを加

Fig. 4-2-1. Procedure of progesterone radioimmunoassay



え、その $\frac{1}{2}$ 量と回収率と求めるために用いた。
 残りの $\frac{1}{2}$ 量にはさらに progesterone- ^3H 10,000
 dpm を加え、 60°C 以下、 N_2 ガス下で乾固した。
 ついで適正な倍数に希釈した抗血清 0.25 ml
 を加え、充分振盪したのち室温で30分放置し
 た。結合理型および遊離の progesterone- ^3H の分離
 には硫酸塩析法を用いた。すなわち、50% 硫
 酸アンモニウム液 0.25 ml を加え、よく混和し
 室温で10分間放置したのち、 $3,000\text{ rpm}$ 、10分間
 遠沈し蛋白質を沈澱させた。その上層 0.2 ml
 を counting vial にとり、ジオキサンシンチレ
 ター 10 ml を加えて、液体シンチレーションカ
 ウンターにて放射能を測定した。測定値から
 progesterone- ^3H の結合率(% bound)を求め、標準
 曲線から progesterone 量を算出した。

4). competitive protein binding assay 法.

competitive protein binding assay 法⁷⁴⁾による血中 progesterone⁷⁵⁾の測定は山本ら、鳥居らの方法に準じて

行なった。すなわち、被検血漿 0.3 ml にその 10 倍量の n -ヘキサンを加え、抽出を 1 回行なった後、2,000 rpm で 2 分間遠心分離し、 n -ヘキサン層 2 ml を他の試験管に移し N_2 が下で蒸発乾固させた。これに約 10,000 dpm の progesterone- 3H を加え蒸発乾固させた後 0.5 ml の progesterone 結合蛋白 (妊娠後期モルモット血漿、稀釈倍数 3,000 倍) を加え、 $37^\circ C$ で 5 分間感作した後、 $4^\circ C$ で 15 分間競合を行なった。これにデキストランで coating したフロリジル 40 mg を加え、1 分間激しく振盪して遊離型 progesterone- 3H の吸着を行ない、暫時放置後上清の 0.2 ml を counting vial に移し、放射活性を計測した。サンプルと同様な操作を行なって得られた標準曲線から progesterone 量を算出した。

5). 蛍光法

蛍光法による血中 progesterone の測定は第 2

節で述べた方法に従った。

6). 実験牛および血液材料

性周期における progesterone 測定用の血液材料はホルスタイン種経産牛3頭ならびに黒毛和種経産牛4頭について延13性周期にわたり採血したものである。また発情期の progesterone の動態を詳細に検討するためを用いた供試牛は黒毛和種1頭で、本牛については発情開始から排卵までの54時間の間、2時間々隔で血液を採取した。血液材料は頸静脈から採取したヘパリン血総計185例で採血後血漿を直ちに分離して測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。

3. 17α -hydroxy-progesterone と 20β -hydroxy-progesterone の測定

1). 試薬

回収率の補正のために測定に使用した放射性 17α -hydroxy-progesterone は 17α -hydroxy-progesterone- $3H$ (Radiochemical center 比放射能 $14.8 Ci/mM$) である。また 20β -hydroxy-progesterone については市販の標識ホルモンがないため、神戸川⁷⁷⁾らから百鬼⁷⁶⁾らの方法で作成したものを使用した。すなわち progesterone- $1,2-3H$ (Radiochemical center 比放射能 $53 Ci/mM$) と NADPH 存在下で 20β -hydroxy-steroid dehydrogenase と反応し、 20β -hydroxy-progesterone- $1,2-3H$ に転換したものである。非放射性 17α -hydroxy-progesterone ならびに 20β -hydroxy-progesterone その他のステロイドはすべて帝國臓器製薬(株)より提供を受けたものである。

17α -hydroxy-progesterone ならびに 20β -hydroxy-progesterone の分離精製には Sephadex LH-20 を用い

た。抗血清希釈用緩衝液, シンテレーター, 放射活性測定機器ならびにその他の試薬等は本章第1, 2項で用いたものと同種のものがある。

2). 17α -hydroxy-progesterone-oxime-牛血清アルブミン, 20β -hydroxy-progesterone-oxime-牛血清アルブミンの合成および抗血清の作成とその特徴

抗原とした 17α -hydroxy-progesterone-oxime-牛血清アルブミンおよび 20β -hydroxy-progesterone-oxime-牛血清アルブミンはまず 17α -hydroxy-progesterone ならびに 20β -hydroxy-progesterone 各々の $3(0$ -carboxymethyl)oxime 誘導体を作成し, これに牛血清アルブミンを結合して合成したものである。抗血清は第1, 2項で述べたものと同方法で作成され, この抗血清を用いた時の radioimmunoassay による 17α -hydroxy-progesterone 及び 20β -hydroxy-progesterone の標準曲線は図4-

3-2 および 3 に示す通りである。また抗血清の他のステロイドに対する交叉反応をそれぞれ表 4-3-1 および 2 に示した。

3). 17α -hydroxy-progesterone および 20β -hydroxy-progesterone の測定法。

牛血中 17α -hydroxy-progesterone ならびに 20β -hydroxy-progesterone の抽出, 分離精製および radio-immunoassay 法は吉田ら⁷⁸⁾ ならびに神戶川ら⁷⁷⁾ の方法に準じて行なった。その概要を図 4-3-1 に示した。

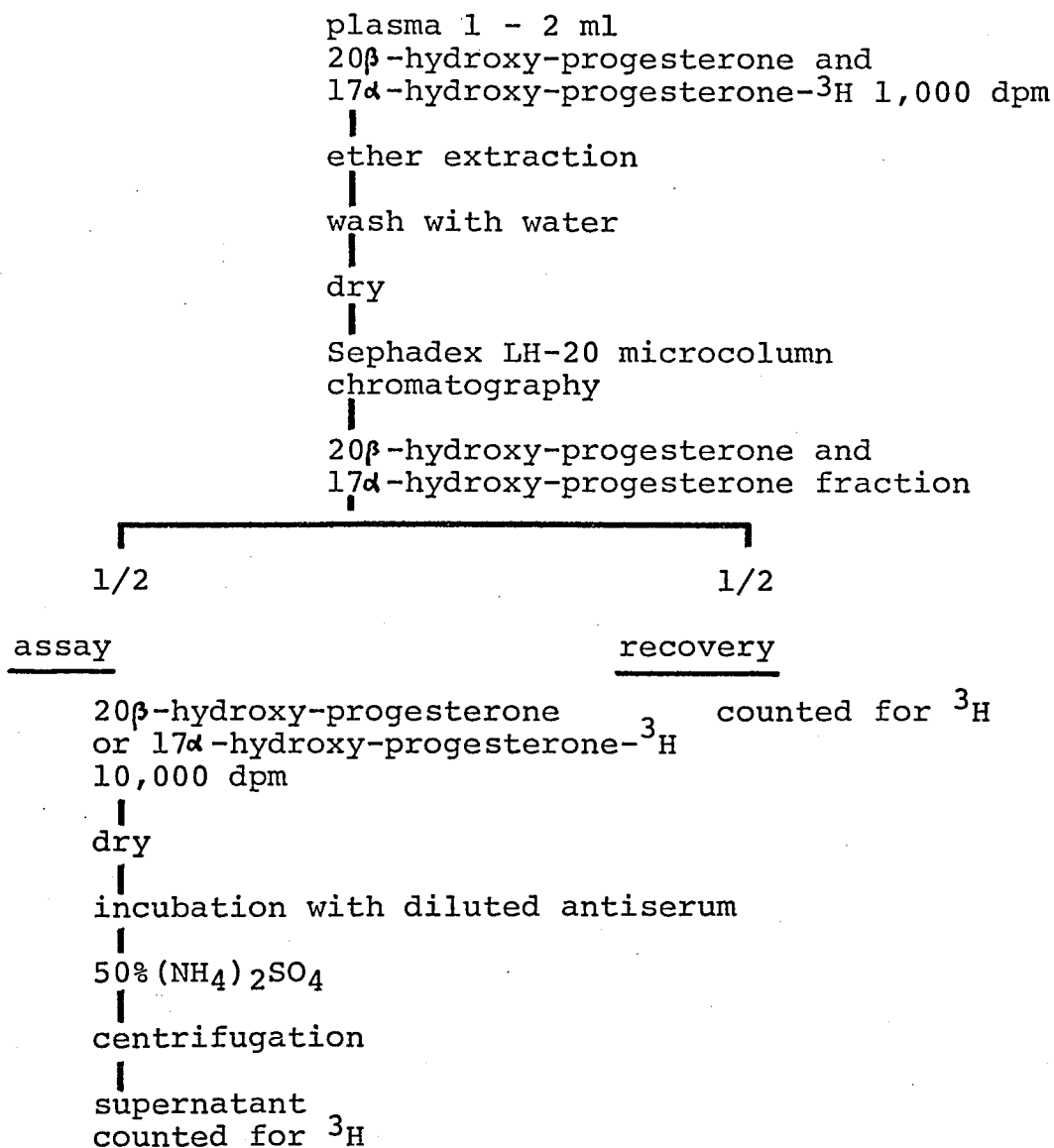
a. 抽出, 分離精製 : 回収率を求めするためには 12 ml 容量の共栓遠沈管に 10^3 dpm の 17α -hydroxy-progesterone, 20β -hydroxy-progesterone- $3H$ を取り乾固させ, これに被検血漿 1~2 ml を加え, その 5 倍量のエーテルで抽出を 1 回行ない, 下層を捨て水を加えて水洗したのち, エーテル層を他のフラスコに移し減圧下で蒸発乾固

させた。

17 α -hydroxy-progesterone ならびに 20 β -hydroxy-progesterone の分離精製は Sephadex LH-20 を用いた小カラムクロマトグラフィーにより行った。すなわちヘキサン : ベンゼン : メタノール (90 : 5 : 5) で一夜膨潤させた Sephadex LH-20 をカラム (2ml のツベルクリン注射筒) につめ、溶媒を充分流し、ベツトを安定させたのち、抽出物をカラムにのせた。

b. radioimmunoassay 法 : 17 α -hydroxy-progesterone と 20 β -hydroxy-progesterone とをそれぞれ 1 画分の溶出液を N_2 ガス下で乾固させたのち、一定量のメタノールを加え、その $\frac{1}{2}$ あまりは $\frac{1}{5}$ 量を回収率測定用とし、残りを 17 α -hydroxy-progesterone ならびに 20 β -hydroxy-progesterone 測定に用いた。まず、それぞれ 1 画分に 10^4 dpm のトリチウムを加え、 $60^\circ C$ 以下、 N_2 ガス下で乾固した。ついで適正に希釈した抗血清 (本実験では 17 α -hydroxy-progesterone は 25,000 倍, 20 β -hydroxy-

Fig. 4-3-1. Procedure of 20β -hydroxy-progesterone and 17α -hydroxy-progesterone radioimmunoassay



progesterone は 10,000 倍希釈) 0.25 ml を加え, 室温で 30 分間感作した。結合型および遊離型ステロイド-3H の分離には硫酸塩析法を用いた。遠沈により結合型を沈澱させたのち, 上層 0.2 ml を counting vial にとり放射能を測定した。計数値からステロイド 3H の結合率 (% bound) を求め, 標準曲線から 17 α -hydroxy-progesterone ならびに 20 β -hydroxy-progesterone 量を算出した。

4) 実験牛および血液材料

供試牛は正常性周期を営む黒毛和種経産牛 2 頭 (牛 Nos. 103, 128) である。内訳は性周期の全期間, 連日採血したものの (牛 No. 103) ならびに発情開始から排卵までの 54 時間のあいだ 2 時間々隔で採血したものの (牛 No. 128), それぞれ 1 頭宛である。血液材料は頸静脈から採取したヘパリン血総計 48 例で, 採血後血漿を直ちに分離して, 測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。

第2節 実験成績

1. estrogen の測定

1) 測定法の検討

a. 標準曲線 : estrone, estradiol-17 β , estriol の純品 0, 20, 50, 100, 200, 500 pg と夾底試験管にとり, 前述した方法に従って radio-immunoassay と行なう標準曲線を作成した。その結果, 0~500 pg の範囲内で良好な曲線が得られた (図 4-1-3, 4, 5)。

b. 抗血清の特異性 (交叉反応) : estrogen 抗血清の各種ステロイドに対する交叉反応をそれぞれのステロイドについて反応曲線を作成して検討した (表 4-1-1~3)。その結果, estrone-17-牛血清アルブミンに対する抗血清では estradiol-17 β に 61.5%, 16-epi-estriol 22.6%, 16 keto-estradiol 8.3% とかなり交叉したが,

estriol には 2.2% と低く, testosterone, progesterone との交叉は低かった。estradiol-17 β 抗血清では estrone sulfate に 8.0%, 16-epiestriol に 5.3% 交叉した以外は他のステロイドとの交叉はほとんど認められなかった。estriol-6-牛血清アルブミンに対する抗血清では estrone sulfate が 32.5% と大きく交叉したが他のステロイドとの交叉は全般に低いものであった。

C. 精度ならびに感度 : 蒸留水に一定量の純品の estrogen を加えたものを使用して本報の精度を検討した結果, 10 pg 以上で変動係数はいずれも 20% 以下となり, 本測定法はほぼ満足し得るものであった(表 4-1-4)。なお蒸留水のみを用いて全測定操作を行なって求めたブランク値は estrone 1.8 ± 0.9 pg, estradiol-17 β 2.9 ± 1.7 pg でいずれも無視してよい程度の低い値であったが, estriol は若干高く 14.4 ± 2.9 pg であった。以上の結果から本法の測定感度は, estrone, estradiol-17 β で 10 pg,

estriol で 20 pg であることが認められた。

d. 分離, 精製 : Sephadex LH-20 を用いたミニフロカラムフロマトグラフィによる estrogen 3 分画の溶出分取部位は estrone 1.8~2.5 ml, estradiol-17 β 2.9~4.0 ml, estriol 5.0~6.8 ml (図 4-1-2) の間であり, さらに血漿 10 ml に estrogen- ^3H を加えて抽出した場合の溶出パターンもこれとよく一致した。なお血漿に加えた estrogen- ^3H の全操作を通じた平均回収率 (\pm S.D) は 106 例の材料で estrone 86.2 (\pm 13.1)%, estradiol-17 β 82.8 (\pm 8.6)%, estriol 68 (\pm 15.8)% であった。

2). 性周期における動態

6 頭の牛の性周期における末梢血中 estrogen の消長を図 4-1-6, 7 に示した。estrone, estradiol-17 β が性周期の全期間を通じて認められた。すなわち estradiol-17 β の値は全期間を通じて

estrone にくらべてかなり高レベルを示したが、両者はほぼ平行して増減した。一方ほう estriol はほとんどの例で検出できなかったが、検出できたものでもその測定値には特徴的な変動が認められなかった。このことから本報告では estriol についての成績は削除した。

estrogen の濃度水準ならびに最高値に達する時期、また減少の時期は個体によりかなり大きな差異があることを認めた。すなわち総 estrogen 値 (estrone + estradiol-17 β) は6頭中3頭 (Nos. 86, 95, 97) では排卵後に低値 (5.4~6.0 pg/ml) を示し、黄体期の3~12日にかけてピーク (9.0~10.5 pg/ml) を形成したのち、次の排卵3~1日前にふたたび鋭いピーク (10.6~19.5 pg/ml) を形成した。一方ほう残りの3頭 (Nos. 103, 86, 88) の黄体期における estrogen 消長は明瞭なピークを示さず、かなり高いレベル (5.7~11.8 pg/ml) で経過するもの、および低いレベル (2.4~7.5 pg/ml) で経過するものなど区々であった。しかし次の排卵2~1日前

Table 4-1-1. Cross reaction of estrone-17-bovine serum albumin antiserum with various steroids

(dilution of antiserum 1 : 130,000)

Compounds	% Cross reaction
Estrone	100
Estradiol-17 β	61.5
Estriol	2.2
2-Mthoxyestrone	0.1
Estrone-sulfate	1.5
16-Ketoestradiol	8.3
16-Epiestriol	22.6
Estriol-glucuronide	2.0
Testosterone	0.2
Androst-4-ene-3,17-dione	< 0.04
Progesterone	< 0.04
17 α -Hydroxyprogesterone	< 0.04
Cortisol	< 0.04
Corticosterone	1.0
Diethylstilbesterol	< 0.1

Table 4-1-2. Cross reaction of estradiol-6-bovine serum albumin antiserum with various steroids

(dilution of antiserum 1 : 50,000)

Compounds	% Cross reaction
Estrone	3.20
Estradiol-17 β	100
Estriol	1.77
2-Methoxyestrone	< 0.08
Estrone-sulfate	8.00
16-Ketoestradiol	0.80
Estradiol-17 α	0.80
16-Epiestriol	5.33
Estriol-glucuronide	< 0.08
Testosterone	0.29
17 α -Hydroxyprogesterone	0.08
Cortisol	< 0.08
Corticosterone	< 0.08
Pregnenolone	< 0.08
Cholesterol	< 0.08
Androst-4-ene-3,17-dione	0.44
Progesterone	< 0.08

Table 4-1-3. Cross reaction of estriol-6-bovine serum albumin antiserum with various steroids

(dilution of antiserum 1 : 30,000)

Compounds	% Cross reaction
Estrone	< 0.08
Estradiol-17 β	0.52
Estriol	100
2-Methoxyestrone	< 0.08
Estrone-sulfate	32.5
16-Epiestriol	4.33
16-Ketoestradiol	< 0.08
Estriol-glucuronide	0.41
Testosterone	< 0.08
Androst-4-ene-3,17-dione	0.13
Dehydroepiandrosterone	< 0.08
Progesterone	< 0.08
17 α -Hydroxyprogesterone	< 0.08
Cortisol	< 0.08
Corticosterone	< 0.08
Cortison	< 0.08
Pregnenolone	< 0.08
Cholesterol	< 0.08

Table 4-1-4. Accuracy of the radioimmunoassay

Estrogen examined	Amount of estrogen*	Value obtained	Coefficient of variation
Estrone	0 pg	1.8 ± 0.9 pg**	50.0 %
	10	12.5 ± 2.0	16.0
	20	21.8 ± 2.5	11.5
	50	55.0 ± 4.7	8.5
Estradiol	0	2.9 ± 1.7	58.6
	10	12.9 ± 2.3	17.8
	20	24.0 ± 2.9	12.0
	50	55.6 ± 3.5	6.2
Estriol	0	14.4 ± 2.9	20.1
	10	23.7 ± 3.2	13.5
	20	32.9 ± 3.5	10.6
	50	66.7 ± 4.5	6.7

* Dissolved in 8 ml of distilled water

** M ± S.D. (n=7)

Fig. 4-1-2. Chromatographic pattern of estrone, estradiol-17 β and estriol in Sephadex LH-20 microcolumn

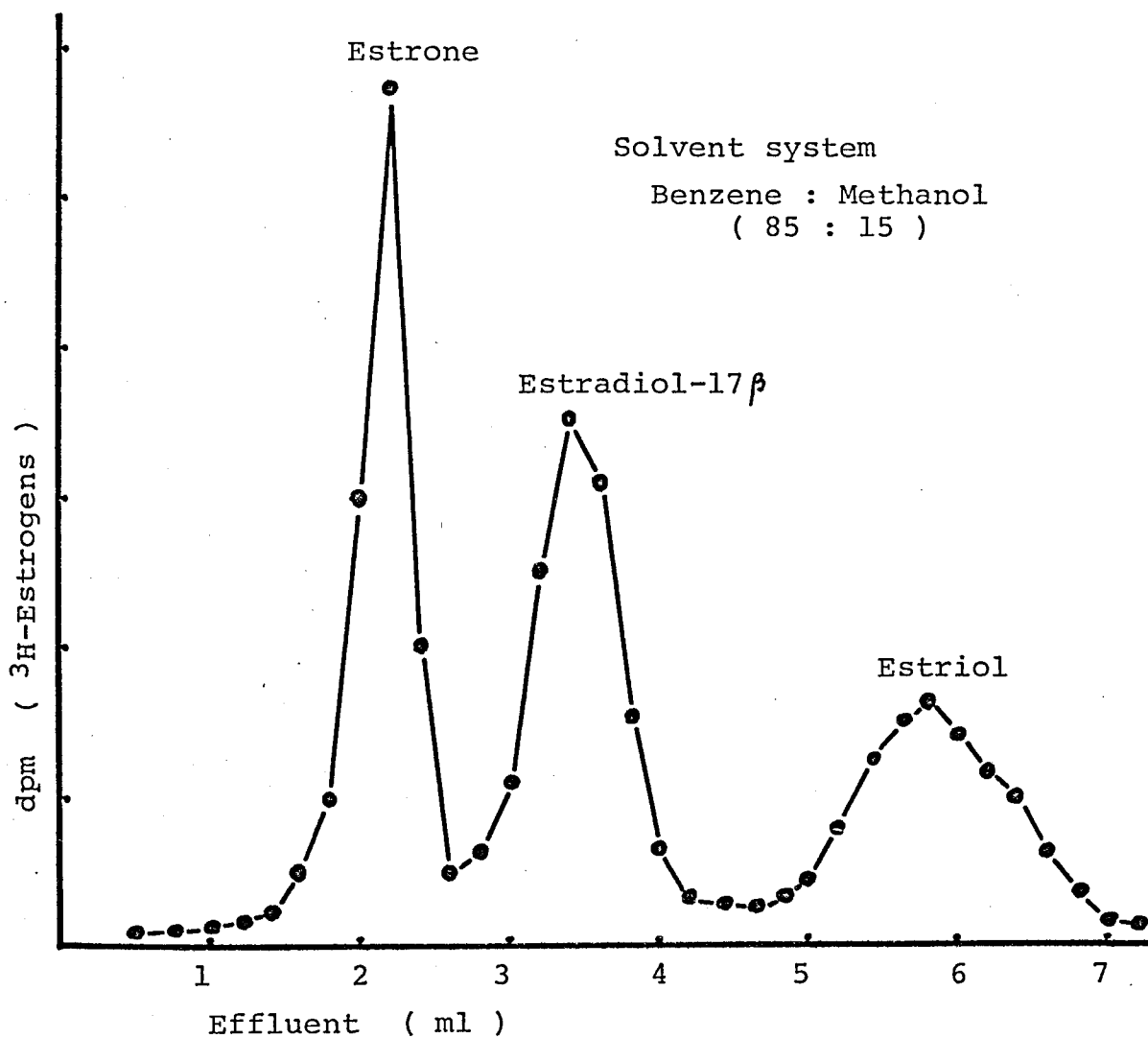


Fig.4-1-3. Standard curve for estrone

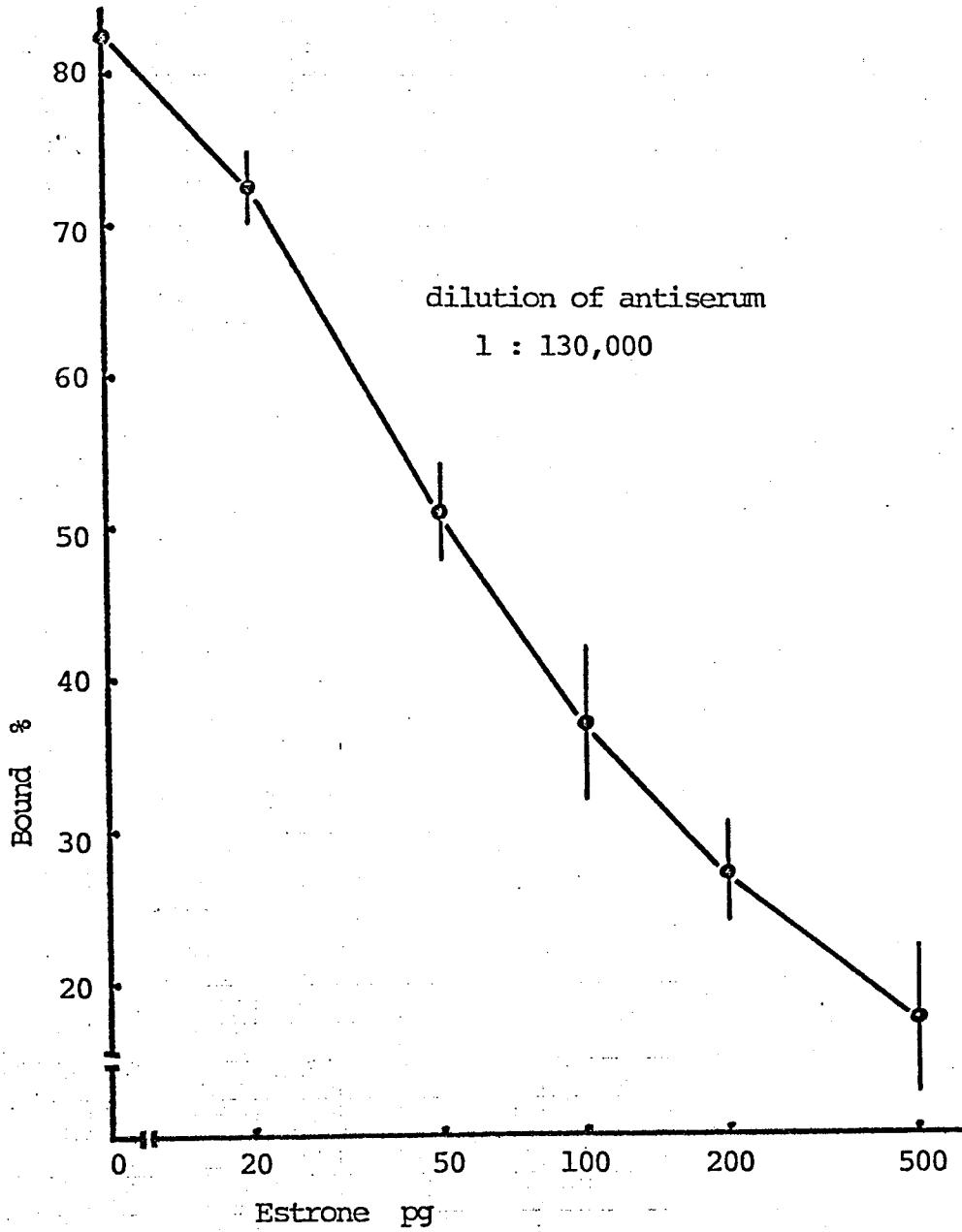


Fig.4-1-4. Standard curve for estradiol-17 β

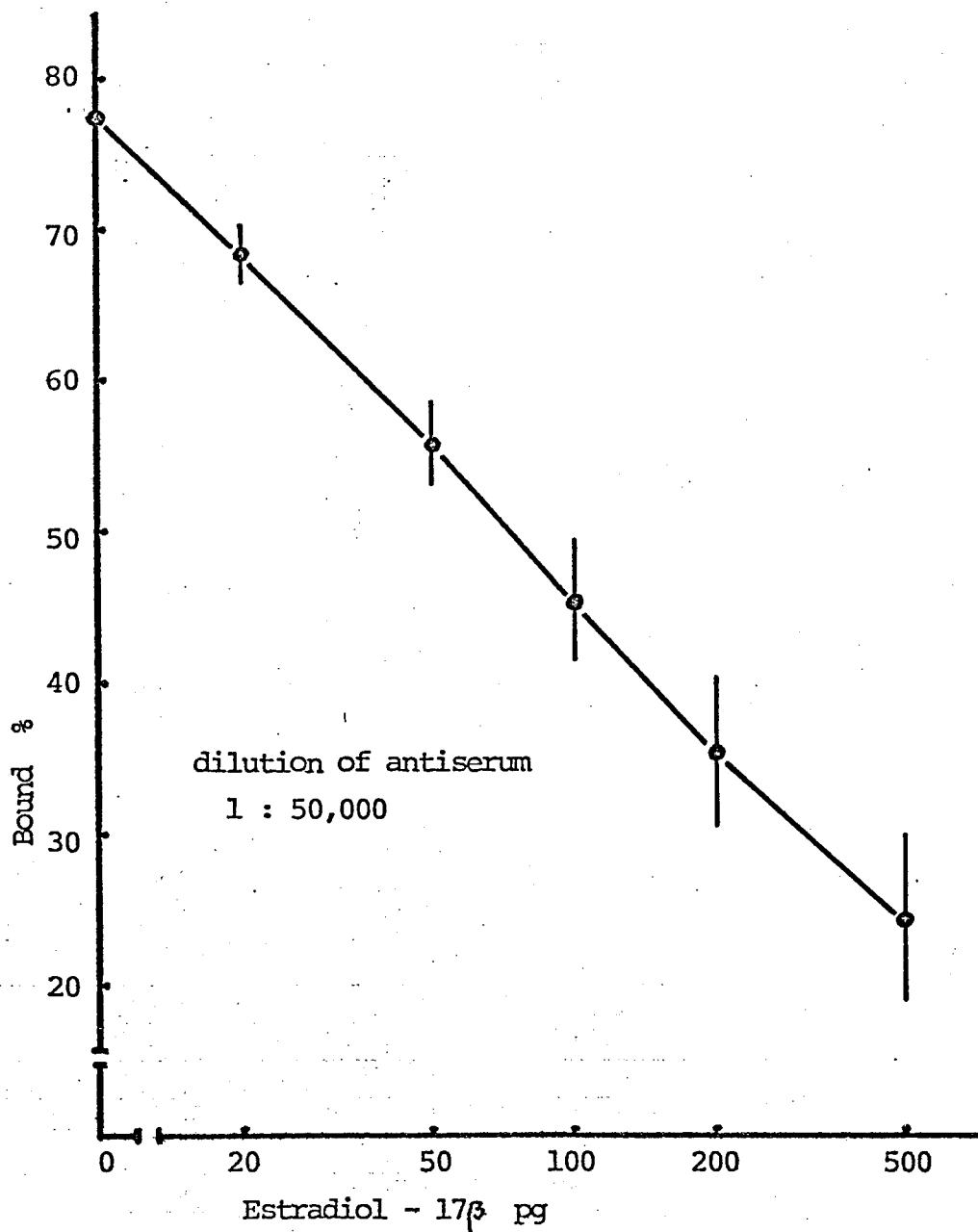


Fig. (1-4)-5. Standard curve for estriol

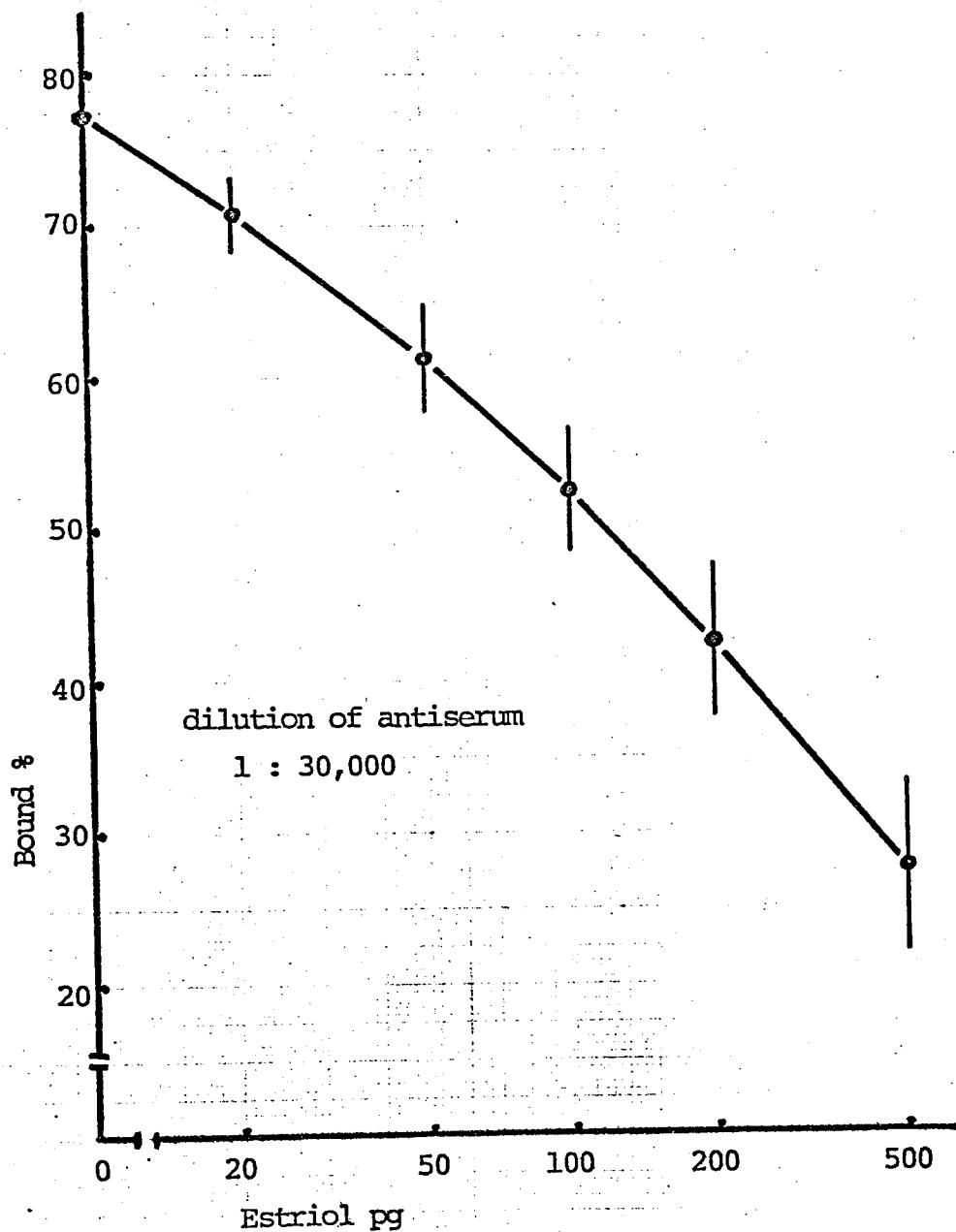
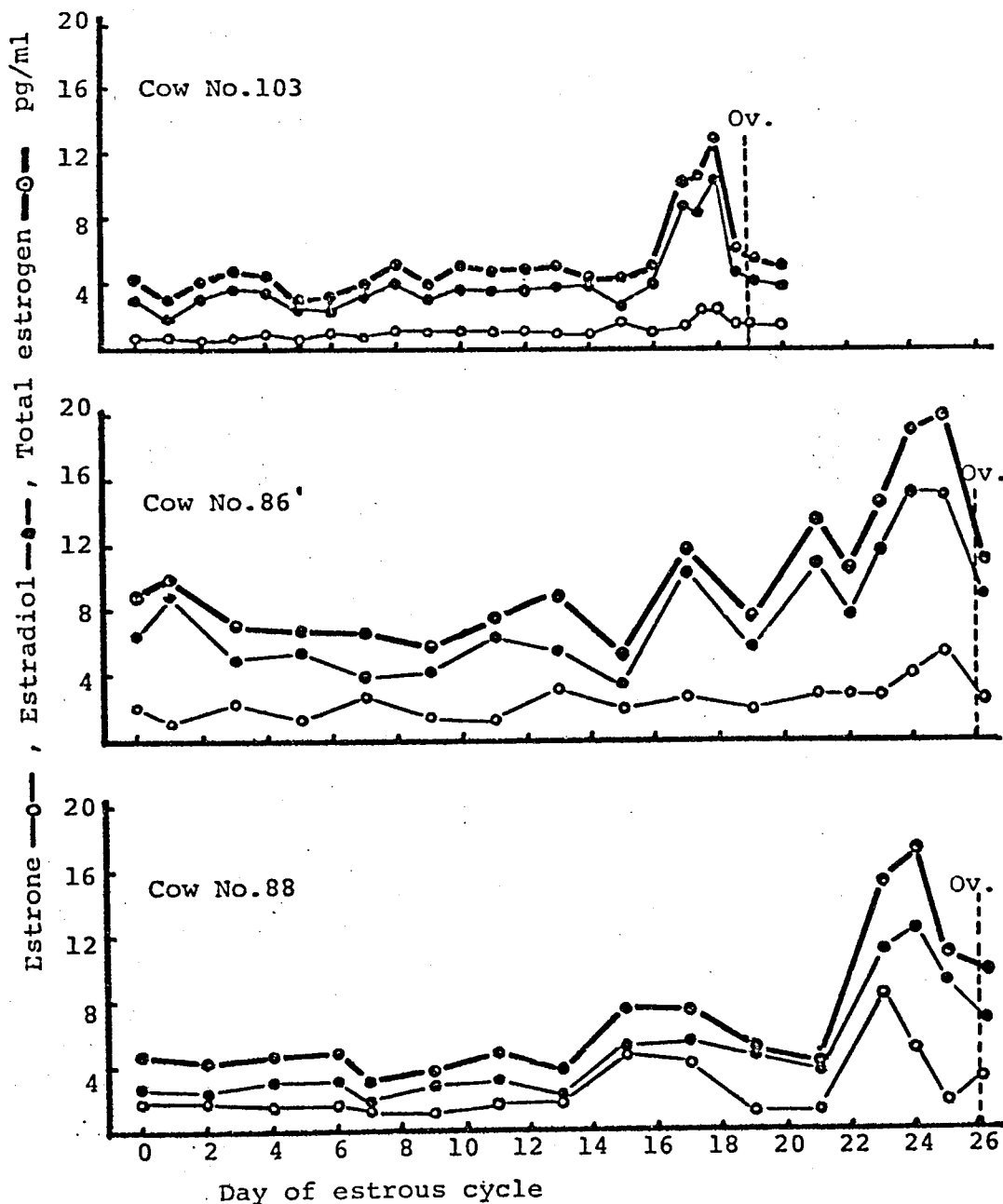


Fig.4-1-6. Peripheral plasma estrogens levels in cows during the estrous cycle



0 : day of ovulation
Ov. : ovulation

Fig.4-1-7. Peripheral plasma estrogens levels in cows during the estrous cycle

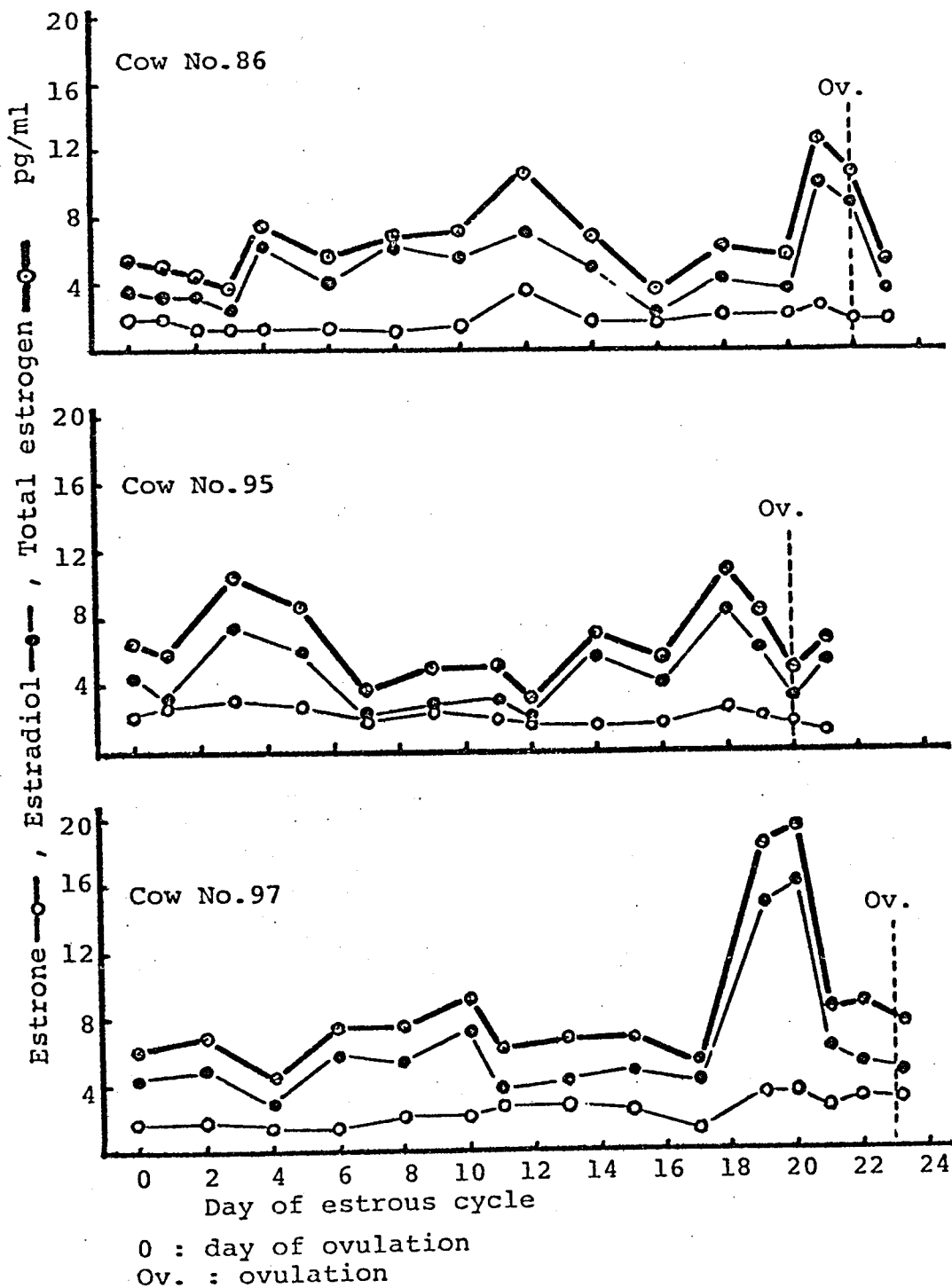
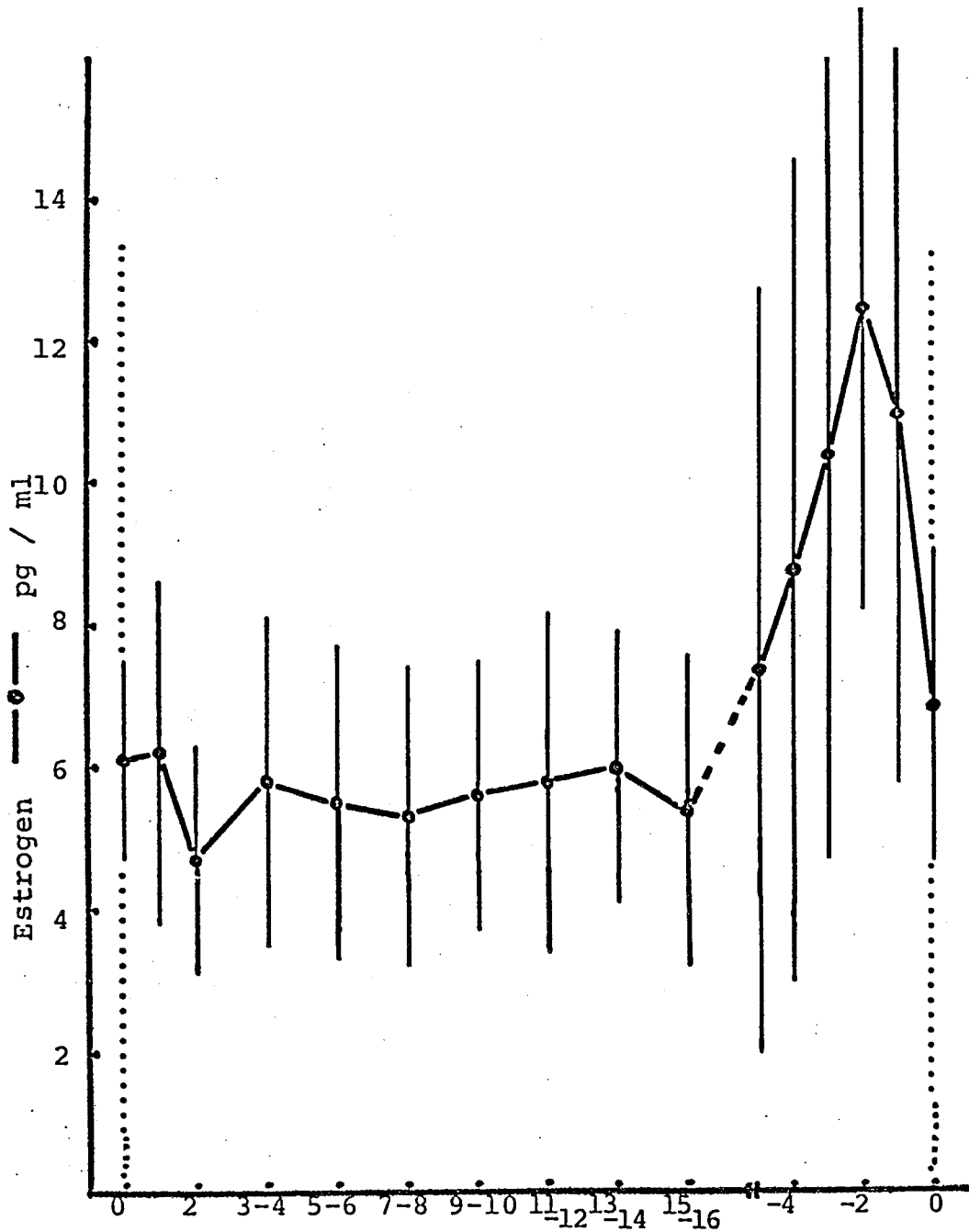


Fig.4-1-8. Peripheral plasma estrogen levels in cows during the estrous cycle



Day of estrous cycle (0 : day of ovulation)
Vertical bars indicate M ± S.D.

にはいずかとも鋭く、かつ高いピーク ($12.7 \sim 20.0 \text{ pg/ml}$) を形成した。

黄体期ならびに排卵前後の血中 estrogen の消長について、6頭の牛の測定値をまとめて図 4-1-8 に示した。総 estrogen 値は排卵前 5 ~ 4 日頃より急激に上昇 ($8.8 \pm 5.8 \text{ pg/mL}$) し、3 ~ 1 日前 ($10.4 \pm 5.9 \sim 12.5 \pm 4.4 \text{ pg/mL}$) にかけて高値を示したのち排卵時には急激に減少 ($6.9 \pm 2.2 \text{ pg/ml}$) し、排卵後 1 日目に最低値 ($6.1 \pm 1.9 \text{ pg/ml}$) を示した。

2. progesterone

1). 測定法の検討

a. 抗血清の力価 : 抗血清の力価は、希釈血清に一定量の progesterone- ^3H ならびに 0 ~ 500 pg の progesterone を添加し、各 progesterone 量に比ける progesterone- ^3H と抗体との結合率を

求め、これにより作成した標準曲線が、用量反応曲線として最も優れている抗血清の希釈倍数をもつて表わした。図4-2-2は 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 倍に希釈した抗血清を用いて作成した標準曲線である。 2×10^4 倍では希釈が低く直線性が得られず、 6×10^4 倍では0%における結合率が低く希釈過剰であった。 4×10^4 希釈では0%における結合率が70~80%の範囲にあり、かつ0~400%の範囲においてほぼ直線性を示した。これらの成績から本抗血清の適正希釈倍数は 4×10^4 倍であることを認めた。

b. 抗血清の特異性(交叉反応) : 本抗血清の各種ステロイドに対する交叉反応もそれぞれ別のステロイドについて反応曲線を作成して検討した。すなわち結合率50%における各ステロイドの量を求め、progesterone量との比率に100を乗じた数、すなわち交叉反応百分率を比較した(表4-2-1)。その結果, pro-

gestosterone の交叉反応百分率を 100% とすると 5 α -pregnandione のそれは 42.6% でかなり高かったが、20 α -hydroxy-progesterone は 6.7%, 11-desoxycorticosterone は 6.6%, 20 β -hydroxy-progesterone は 1.9% で低く、さらに、この他のステロイドとの交叉反応はほとんど認められなかった。

c. 測定感度ならびに精度 : 血漿および蒸留水に一定量の純品の progesterone を加えたものを使用して本報の精度を検討した結果、表 4-2-2 に示す通り、ほぼ満足すべき成績が得られた。なお 20 pg 以下では変動係数が 20% を越えるため本報の測定下限は 20 pg であることが認められた。

d. フロマト法および直接法による測定値の比較 : 本実験で使用した抗血清は特異性が高いことから、血漿からの progesterone 抽出操作においてエーテル抽出のみを行なった radioimmunoassay 直接法と、エーテル抽出後

Sephadex LH-20 ミクロカラムクロマトグラフィーによる分離精製を行なったクロマト法について, progesterone 測定値と比較した(表 4-2-3)。その結果, 直接法によっても, クロマト法によってもほぼ等しい測定値が得られることを認めた。

e. progesterone 回収率 : 血漿に加えた progesterone- ^3H の, 全操作を通じたの回収率はクロマト法では $81.9 \pm 7.2\%$ ($M \pm S.D.$ $n=35$), 直接法では $85.2 \pm 4.9\%$ ($n=35$) であった。

2). radioimmunoassay 法, 蛍光法および competitive protein binding assay 法による測定値の比較。

同一血漿を用い, radioimmunoassay 法, 蛍光法および competitive protein binding assay 法による progesterone 測定値をそれぞれ比較した(表 4-2-3)。その結果, これら 3 方法による progesterone 測定値は, ほぼ等しいことを認めた。しかし

、蛍光法による測定値は competitive protein binding assay 法によるそれより、また competitive protein binding 法による測定値は radioimmunoassay 法によるそれより若干高値を示すことを認められた。

3). 性周期に比ける動態

radioimmunoassay 直接法により、延 13 頭の牛について性周期に比ける末梢血中 progesterone の消長を検討した (図 4-2-3)。その結果、progesterone は発情期に最低値 $0.2 \sim 0.3 \text{ ng/ml}$ を示したのち、排卵後 3~4 日頃から増加しはじめ、11~17 日の黄体期に最高値 $1.8 \sim 5.8 \text{ ng/ml}$ に達し、この値を 16~21 日まで維持して、次の排卵前 4~6 日頃から急激に低下することを認められた。すなわち血中 progesterone の消長型は性周期の間は一峰性を示した。しかし、progesterone の濃度水準ならびに最高値に達する時期、また減少の時期は個体によりかなりの差異があることを認められた。

Fig. 4-2-2. Standard curves for progesterone at various concentrations

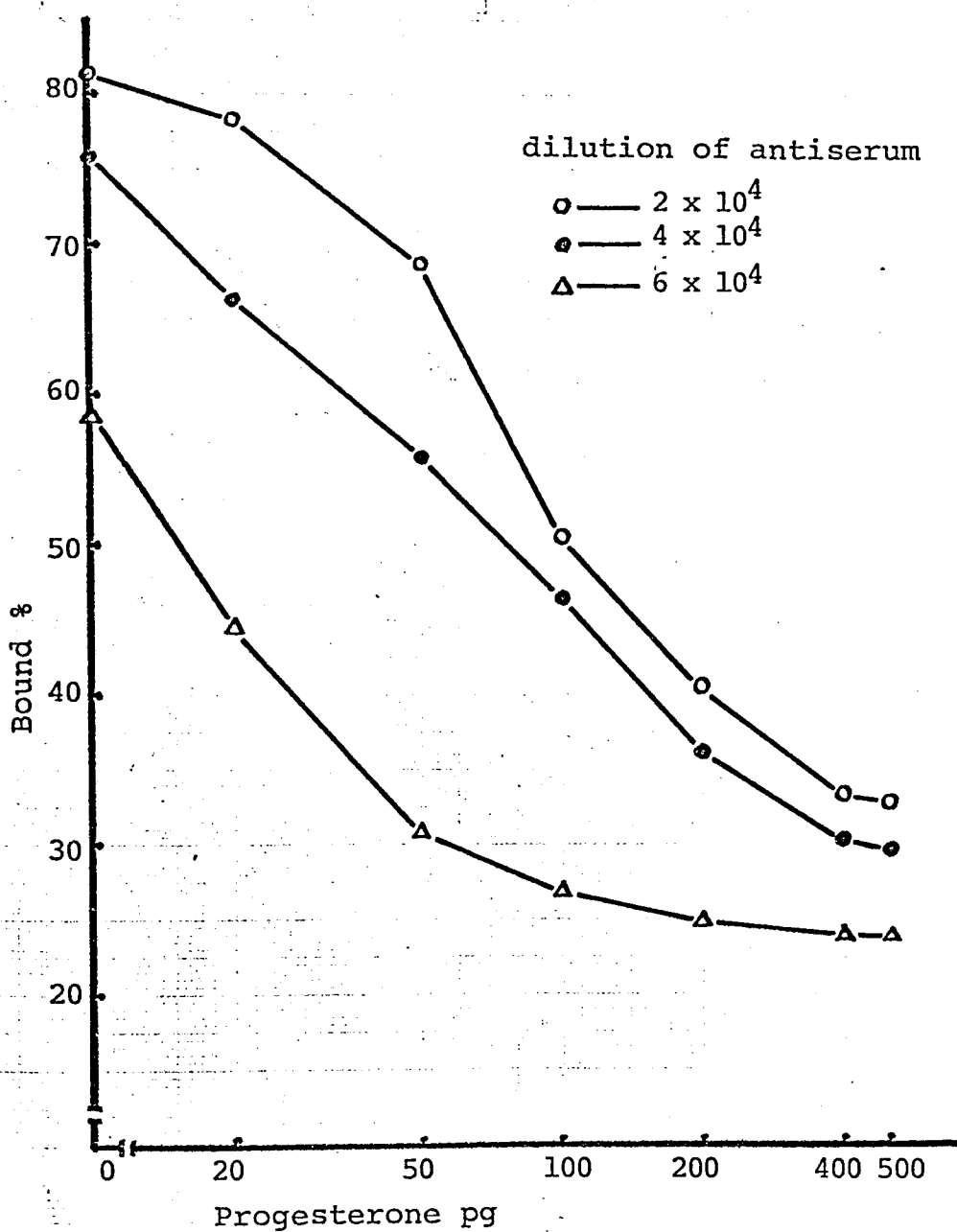


Table 4-2-1. Cross reaction of progesterone-3-bovine serum albumin antiserum with various steroids

(dilution of antiserum 1 : 40,000)

Compounds	% Cross reaction
Progesterone	100
5 α -Pregnanedione	42.6
20 α -Hydroxyprogesterone	6.73
11-Desoxycorticosterone	6.60
20 β -Hydroxyprogesterone	1.89
17 α -Hydroxyprogesterone	0.89
Pregnenolone	1.46
11-Desoxycortisol	0.06
Corticosterone	< 0.06
Cortisol	< 0.06
Cortisone	< 0.06
Aldosterone	< 0.06
5 β -Pregnanediol	< 0.06
Testosterone	0.17
Androst-4-ene-3,17-dione	0.15
Dehydrepiandrosterone	0.06
Estrone	0.06
Estradiol-17 β	0.06
Estradiol-17 α	0.06
Estriol	0.06
Cholesterol	0.06

Table 4-2-2. Accuracy of the radioimmunoassay

vehicles	proges- terone added	values of progesterone	coefficient of variation
	pg	pg*	%
distilled water (0.1ml)	0	6.60 ± 2.81	42.5
	20	26.90 ± 5.12	18.9
	50	55.80 ± 6.84	12.2
	100	98.70 ± 7.32	7.4
bovine blood plasma (0.05ml)	0	109.3 ± 25.3	23.1
	50	166.5 ± 24.5	14.7
	100	205.0 ± 26.5	12.9

*M ± S.D. (n=5)

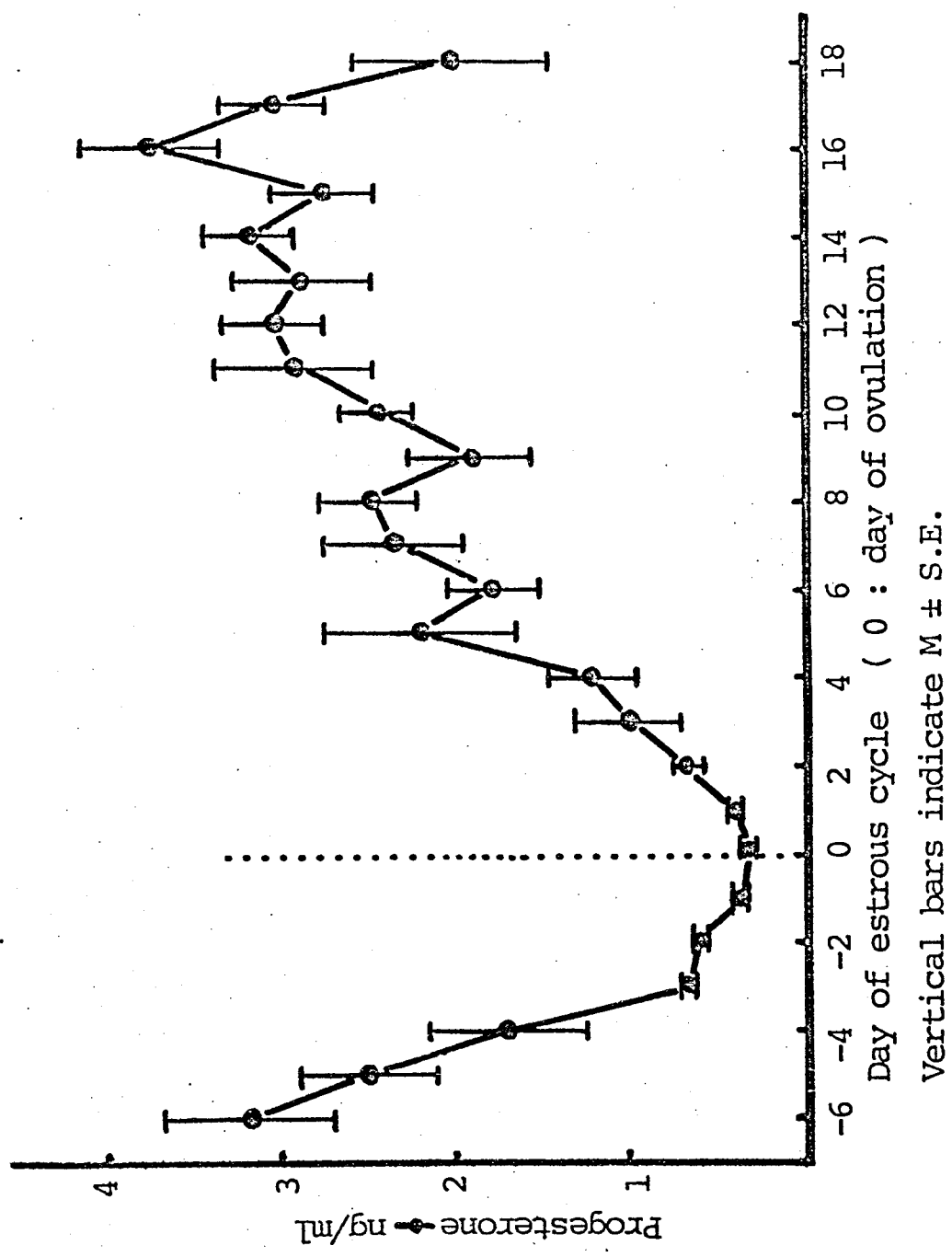
Table 4-2-3. Comparison of plasma progesterone values determined by fluorometric assay, competitive protein binding assay and radioimmunoassay method

plasma samples	radioimmunoassay	
	fluorometric assay	chromatographic direct method
	competitive protein binding assay	
1*	0.33 ± 0.07**	0.21 ± 0.07**
5	1.76 ± 0.29	1.40 ± 0.10
10	4.05 ± 0.54	3.53 ± 0.10
15	3.41 ± 0.30	3.07 ± 0.20
19	0.99 ± 0.11	0.68 ± 0.10

*Day of estrous cycle of the cow (0 : day of ovulation)

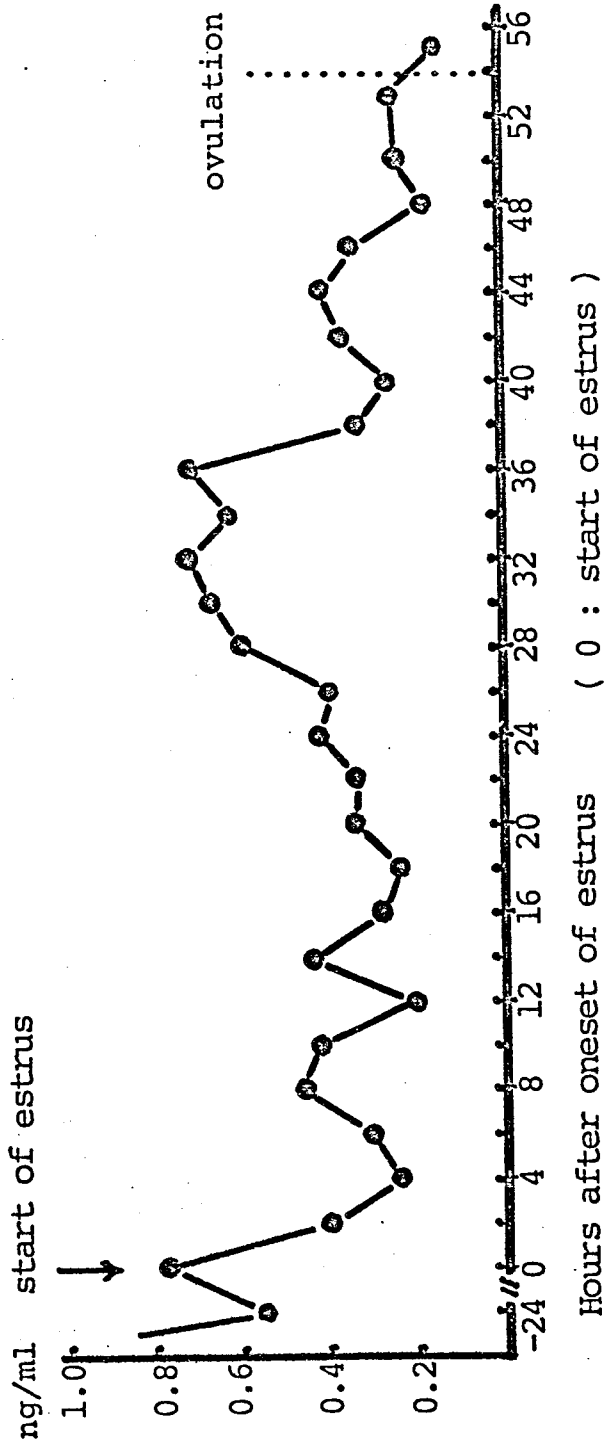
**M ± S.D. ng/ml blood plasma (n=7)

Fig. 4-2-3. Peripheral plasma progesterone levels in cows during the estrous cycle



Vertical bars indicate $M \pm S.E.$

Fig.4-2-4. Peripheral plasma progesterone level in a cow from the occurrence of estrus to ovulation



4). とくに発情期における動態

発情開始から54時間後の排卵までの間、2時間を隔で採取した1頭の牛の血液について progesterone と測定した(図4-2-4)。その結果、progesterone は発情開始後28~36時間の8時間の時間帯、つまり排卵前24~16時間に当たる時期に濃度水準としては軽度ではあるが、明瞭な一過性の上昇を示した。

3. 17α -hydroxy-progesterone ならぬ 20β -hydroxy-progesterone の測定

1). 測定法の検討

a. 標準曲線 : 17α -hydroxy-progesterone, 20β -hydroxy-progesterone の純品 0, 20, 50, 100, 200, 500 pg と平底試験管にとり、前述した方法に従って radioimmunoassay と行なう標準曲線を作成した

。その結果 0~500 pg の範囲内で良好な曲線が得られた(図4-3-2,3)。

b. 抗血清の特異性(交叉反応) : 20β -hydroxy-progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone 抗血清の各種ステロイドに対する交叉反応を検討した(表4-3-1,2)。その結果, 20β -hydroxy-progesterone 抗血清は 20α -hydroxy-progesterone および progesterone にわずかに交叉するのみで他のステロイドとはほとんど反応しなかった。一方 17α -hydroxy-progesterone 抗血清は progesterone に 7.9%, 20α -hydroxy-progesterone に 3.2%, 5α -pregnandione に 1.96% と交叉したが, 他のステロイドとの交叉性はきわめて低いものであった。

c. 精度ならびに感度 : 蒸留水に一定量の純品の 17α -hydroxy-progesterone ならびに 20β -hydroxy-progesterone を加えたものを使用して本法の精度とそれとを検討した結果, 10pg 以上

で変動係数はいずれも 20% 以下となり、本測定法はほぼ満足し得るものであった(表 4-3-3)。なお蒸留水のみを用いて全測定操作を行なって求めたブランク値は 17α -hydroxy-progesterone 5.5 ± 1.8 pg, 20β -hydroxy-progesterone 10.2 ± 3.4 pg ($n=10$) であった。以上の結果から本法の測定感度はそれぞれ 20 pg であることが認められた。

d. 17α -hydroxy-progesterone, 20β -hydroxy-progesterone の分離, 精製 : 溶媒組成 ヘキサン : ベンゼン : メタノール = 90 : 5 : 5 の Sephadex LH-20 を用いたミクロカラムクロマトグラフによる 17α -hydroxy-progesterone と 20β -hydroxy-progesterone の溶出パターンを図 4-3-4 に示した。溶出液分取部位は 17α -hydroxy-progesterone 11.5 ~ 15.5 ml, 20β -hydroxy-progesterone 5.5 ~ 7.5 ml であり, 血漿に加えたことからステロイド- 3 H の全操作を通じての平均回収率 (\pm S.D.) は 65 例の材料で 17α -hydroxy-progesterone

56.1 (± 13.4)%, 20 β -hydroxy-progesterone 75.4 (± 10.2)%であった。

2). 性周期に比ける動態

1頭の牛の性周期に比ける末梢血中17 α -hydroxy-progesteroneならびに20 β -hydroxy-progesteroneの消長を表4-3-4および図4-3-5に示した。これから両ステロイドは排卵後progesteroneとほぼ一致して増加する傾向がみられ、ともに7~8日頃をピークとしてその後漸次低下した。しかし次回の排卵前5日、すなわち性周期の14日目にふたたび増加してピークを形成し、その後急激に減少し、発情時には最低値を示した。

3). とくに発情期に比ける動態

発情開始から54時間後の排卵までの間、2時間を隔てて採取した1頭の牛の血液につい

Fig. 4-3-2. Standard curve for 17 α -hydroxy-progesterone

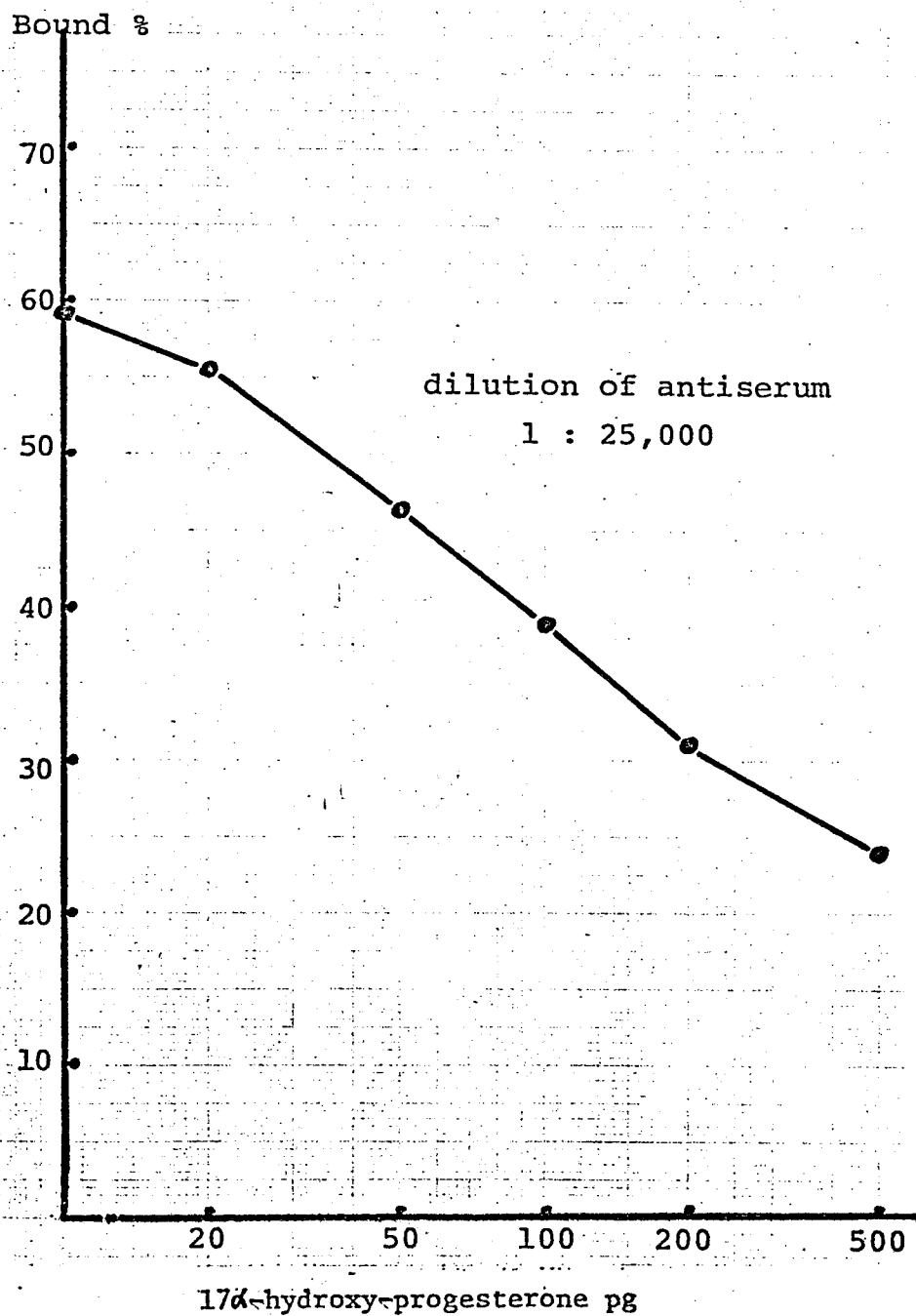


Fig. 4-3-3. Standard curve for 20 β -hydroxy-progesterone

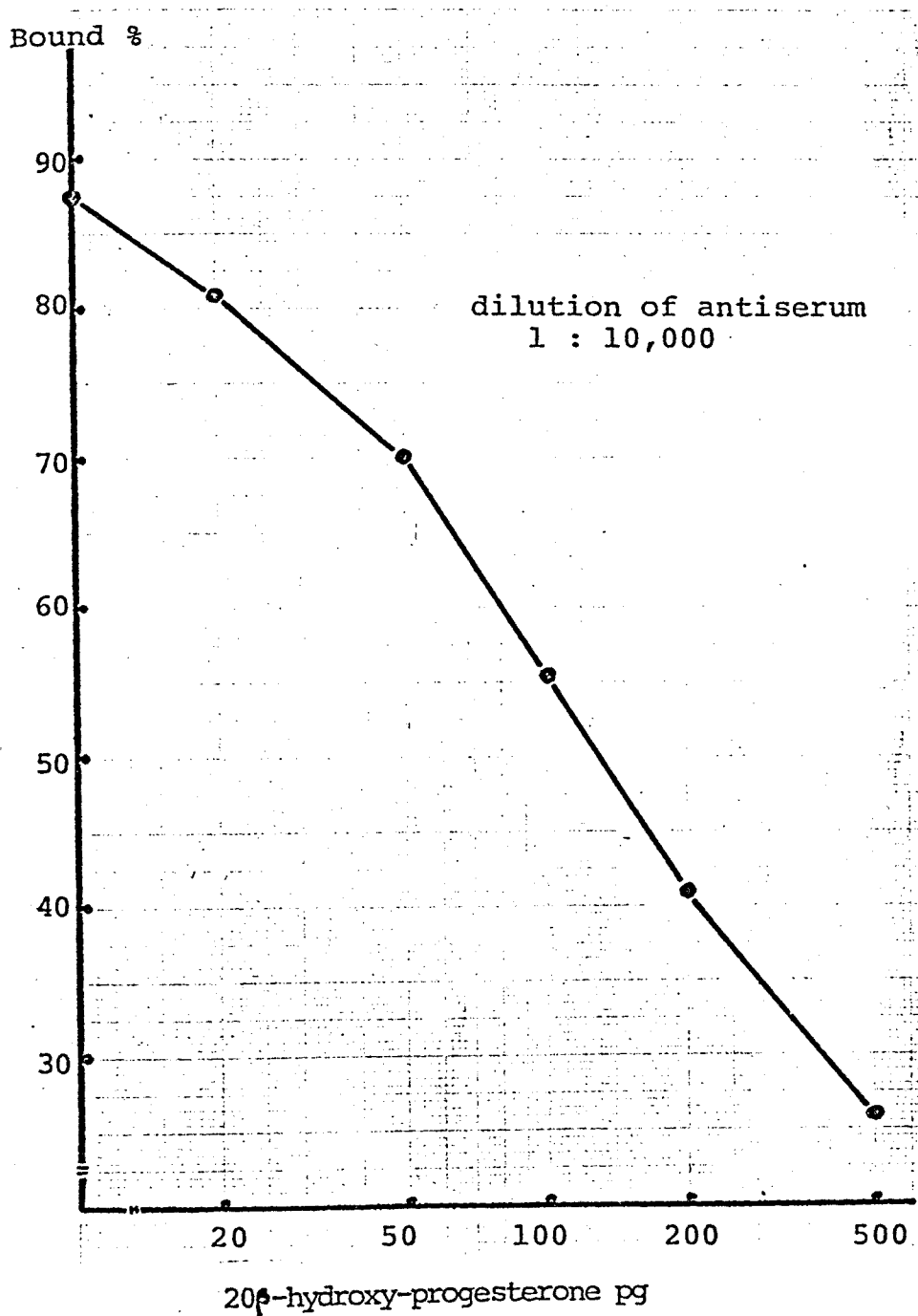


Table 4-3-1. Cross reaction of 17α -hydroxy-progesterone-bovine serum albumin antiserum with various steroids

(dilution of antiserum 1 : 15,000)

Compounds	% Cross reaction
17α -Hydroxyprogesterone	100
Progesterone	7.85
20α -Hydroxyprogesterone	3.23
5α -Pregnanedione	1.96
11-Deoxycortisol	0.88
11-Deoxycorticosterone	0.66
Pregnenolone	0.52
Androst-4-ene-3,17-dione	0.25
5β -Pregnanediol	< 0.08
Corticosterone	< 0.04
Cortisol	< 0.04
Aldosterone	< 0.04
Testosterone	< 0.04
Dehydroepiandrosterone	< 0.04
Estrone	< 0.04
Estradiol- 17β	< 0.04
Estriol	< 0.04
Cholesterol	< 0.04

Table 4-3-2. Cross reaction of 20β -hydroxy-progesterone-bovine serum albumin antiserum with various steroids

(dilution of antiserum 1 : 10,000)

Compounds	% Cross reaction
20β -Hydroxyprogesterone	100
20α -Hydroxyprogesterone	1.69
Cortisol	< 0.02
Cortisone	< 0.02
Corticosterone	< 0.02
11-Desoxycortisol	0.02
DOC	0.45
Aldosterone	< 0.02
11-Dehydrocorticosterone	< 0.02
Pregnenolone	< 0.02
Progesterone	1.04
17α -Hydroxypregnenolone	< 0.02
17α -Hydroxyprogesterone	< 0.02
Testosterone	0.05
Dehydroepiandrosterone	0.04
5α -Dihydrotestosterone	0.02
Androstenedione	0.12
Estradiol- 17β	< 0.02

Table 4-3-3. Accuracy of the radioimmunoassay

Gestagen examined	Amount of gestagen*	Value obtained	Coefficient of variation
20 β -hydroxy-progesterone	0 pg	6.1 \pm 1.6 pg**	26.2 %
	20	25.4 \pm 3.0	11.9
	50	60.3 \pm 5.3	8.8
	100	113.0 \pm 9.2	8.0
17 α -hydroxy-progesterone	0	5.2 \pm 1.9	29.2
	20	25.5 \pm 2.5	9.8
	50	63.5 \pm 3.8	8.8
	100	122.2 \pm 8.8	7.2

* Dissolved in 1 ml of distilled water

** M \pm S.D. (n=7)

Fig. 4-3-4. Chromatographic pattern of progestins in Sephadex LH-20 microcolumn

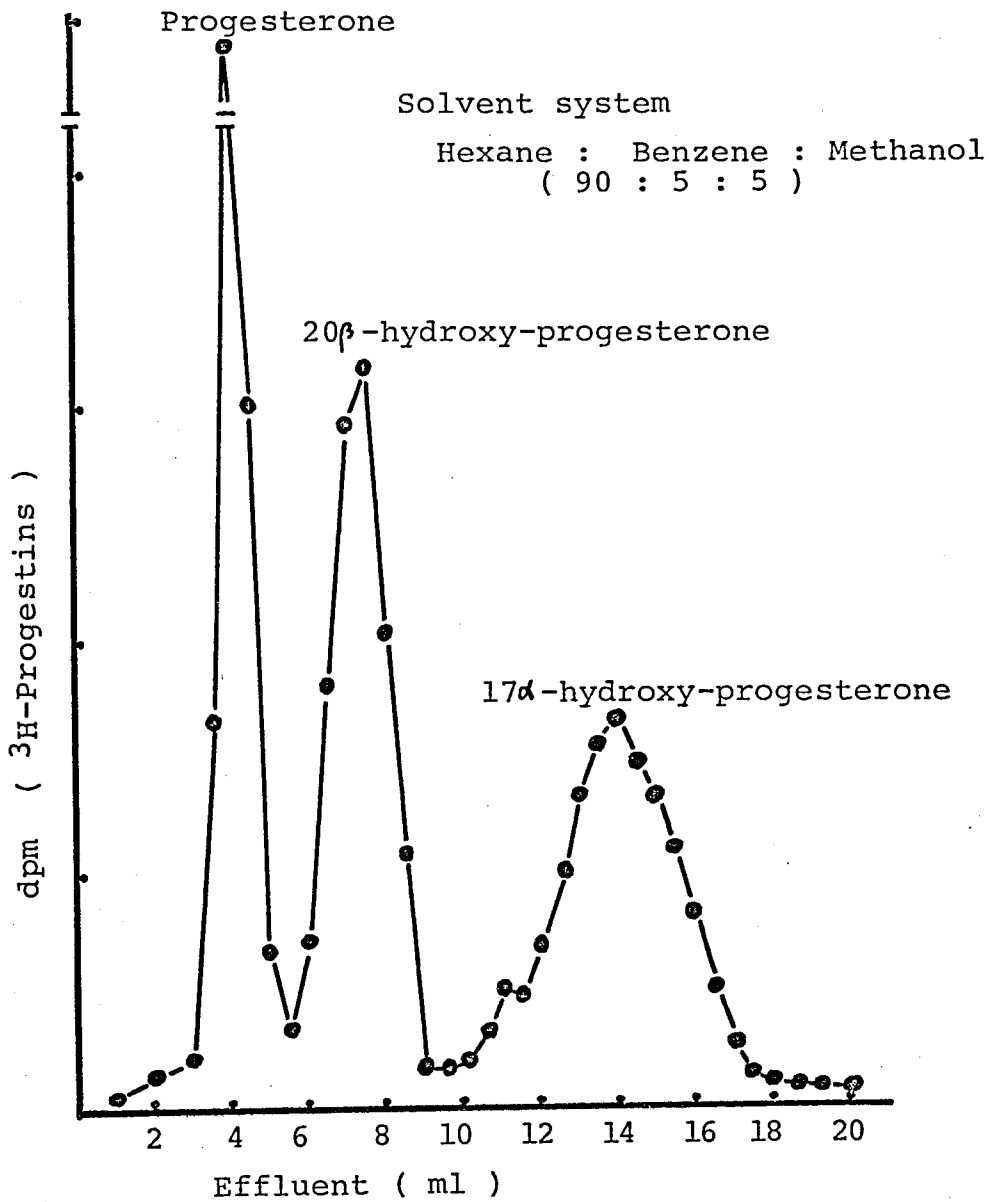


Table 4-3-4. Peripheral plasma progesterone, 20 β -hydroxy-progesterone, 17 α -hydroxy-progesterone and estrogen concentrations in a cow during the estrous cycle

Day of cycle	Progesterone		20 β -hydroxy-progesterone		17 α -hydroxy-progesterone		Estrogen *	
	ng/ml		pg/ml		pg/ml		pg/ml	
1	0.9	0.01	15.0	3.0	3.0			
2	0.7	0.04	20.0	3.1	3.1			
3	0.6	0.07	27.0	4.7	4.7			
4	1.1	0.07	27.9	4.4	4.4			
5	1.3	0.12	58.1	2.4	2.4			
6	1.5	0.16	59.5	3.3	3.3			
7	1.8	0.50	70.8	3.2	3.2			
8	1.8	0.50	90.2	5.9	5.9			
9	1.7	0.36	64.9	3.9	3.9			
10	1.6	0.42	71.6	5.0	5.0			
11	2.2	0.24	61.6	4.6	4.6			
12	2.8	0.31	56.8	4.9	4.9			
13	2.2	0.37	23.7	5.0	5.0			
14	2.1	0.90	102.0	3.9	3.9			
15	2.1	0.51	73.7	4.2	4.2			
16	1.0	0.26	31.6	5.1	5.1			
17	0.7	0.04	26.6	10.1	10.1			
"	0.4	0.02	28.1	10.6	10.6			
18	0.6	0.01	28.3	12.7	12.7			
"	0.4	0.01	5.0	6.0	6.0			
19 (0)**	0.4			5.7	5.7			

* Estrogen : estrone + estradiol

** 0 : day of ovulation

Fig.4-3-5. Steroid concentrations in peripheral plasma of a cow during the estrous cycle

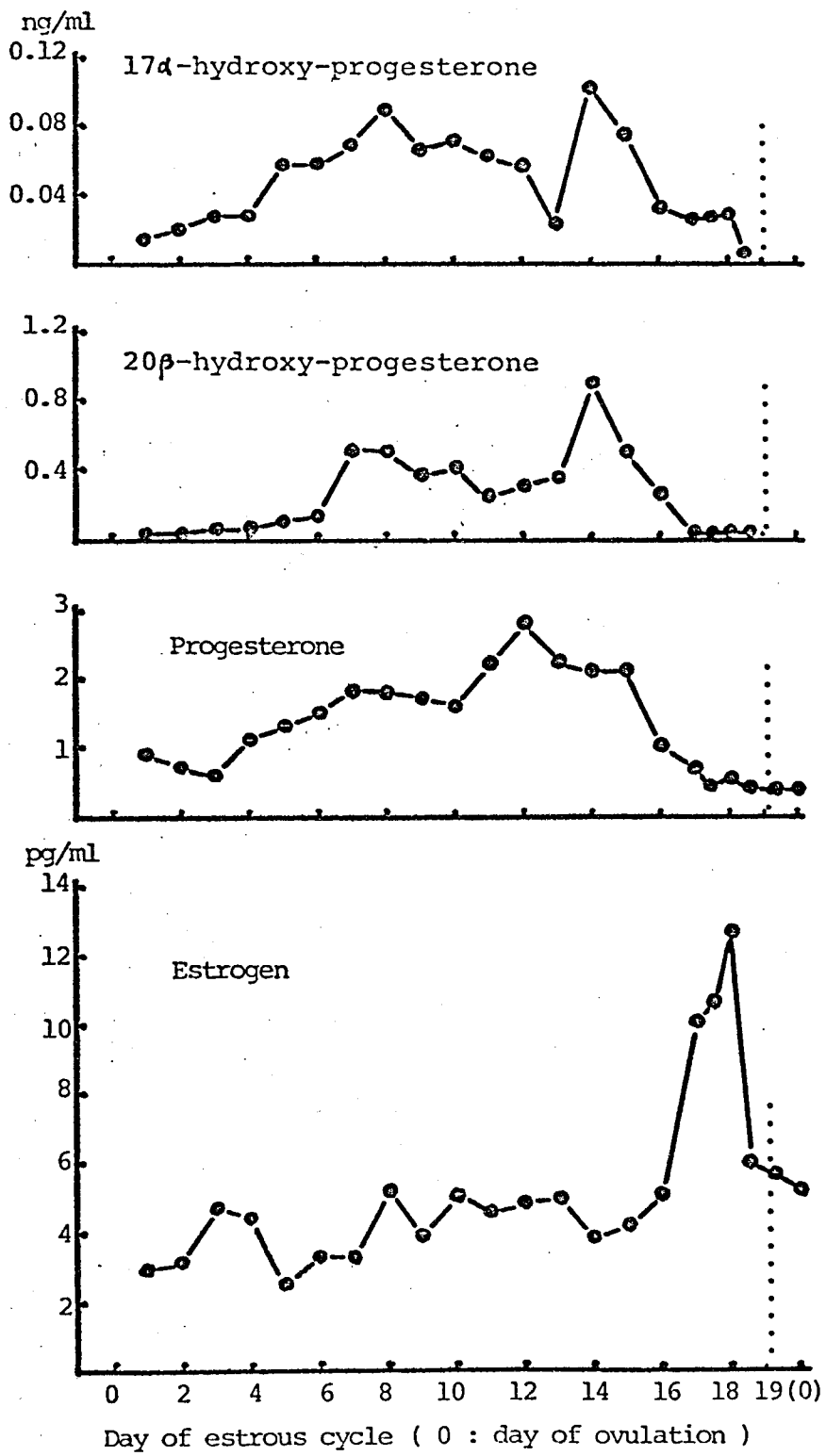
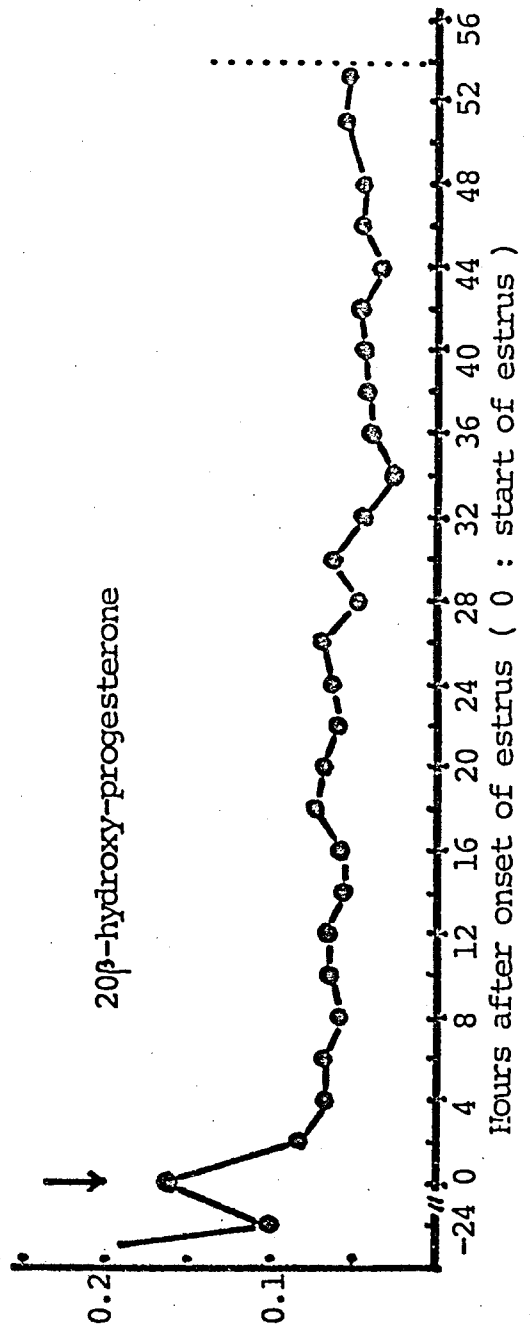
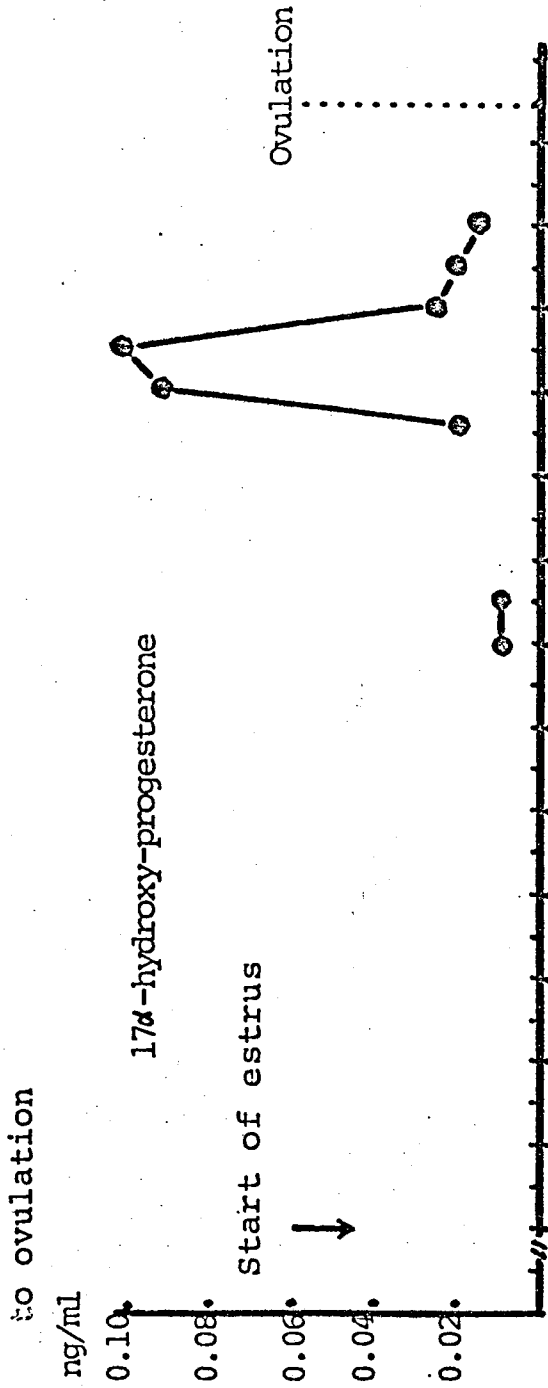


Fig.4-3-6. Peripheral plasma 20β -hydroxy-progesterone and 17α -hydroxy-progesterone level in a cow from start of estrus to ovulation



て 17α -hydroxy-progesterone ならぬに 20β -hydroxy-progesterone を測定し、その結果を図 4-3-6 に示した。 20β -hydroxy-progesterone はこの期間中特に大きな変動を示さず低値で経過したが、 17α -hydroxy-progesterone には特異的な変動が認められた。すなわち 17α -hydroxy-progesterone は発情開始時には測定感度以下で検出し得なかつたが、発情開始後 40~42 時間の時間帯すなわち排卵前 12~14 時間にあたる時期にきわめてシヤ-フ⁷³⁾なピークを形成した。

第3節 考 按

1. estrogen

1). 測定法について

牛末梢血中 estrogen の微量定量と行なう目的で牧野⁷³⁾が作製した estrone-17-oxime-牛血清アル

(estradiol-17 β -6-oxime 牛血清アルブミン)

ブミン⁷²⁾および estriol-6-oxime 牛血清アルブミンに対する抗血清を使用した radioimmunoassay 法について若干検討を加えた。

さわめて微量のホルモンを高い精度で測定する上に重要なことは優れた抗血清を用いる外に試料の純化操作を行なうことである。

Sephadex LH-20 ミフロカラムクロマトグラフィによる純化精製法は分離能がよく、再現性に優れ、かつ盲検値も低く、その上操作が簡便であることが特徴とされている。しかし牛血中 estrogen の分離精製には、大量の血液材料からの抽出物を使用するためには Wu⁷³⁾ が確立したこの方法をそのまま応用した場合、その溶出パターンが乱れる危険がある。本実験では牛血漿 10 ml からの抽出物を estrogen-³H と混和してカラムに注入し、その溶出パターンを検討した結果、estrogen-³H のみによるものと全く同一パターンで分画し得ることを認めた。

また本実験による回収率および測定精度は牧野⁷³⁾が先に報告している値とほぼ一致してい

た。これらのことから牛末梢血中 estrogen の測定系は牧野の方法⁷³⁾にほぼ準拠して行なつてよいことを認められた。

2) 血中動態について

最近、性周期における牛末梢血中 estrogen を radioimmunoassay 法^{80~91)}によつて測定した成績が多数報告されてゐる。本実験では排卵前 3~1 日に鋭い estrogen の上昇^{80~91)}を認められたが、この点は多くの報告とよく一致してゐる。しかし、黄体期における estrogen の濃度水準および消長^{80~91)}の個体差はかなり大きく、estrogen のピーク^{80~91)}形成が黄体初期から黄体期にかけて認められるもの、および明瞭なピーク^{80~91)}を形成しないもの⁸⁸⁾に大別された。Dobson & Dean⁹⁰⁾, Glencross⁸⁸⁾らは黄体初期、すなわち発情後 4~6 日の間に明瞭な 1 峰性のピーク^{80~91)}を形成することと認められている。また Echterkamp & Hansel⁸⁶⁾は性周期の 4 日より 7~8 日に、Henricks⁸²⁾は 9 日に、

⁸⁴⁾ Shemesh らは 4 日 および 11 日, すなわち 黄体期
に 2 峰性の ピーク を示すことを認めている。

Echternkamp & Hansel⁸⁶⁾ は 黄体期 に出現する estrogen
の ピーク は, この時期に出現する 卵胞の 発育
と 顆粒膜および 内葉膜の 細胞分裂の 増加, 顆
粒膜細胞の 肥大などの 関連性を示唆してい
る。本実験では estrogen 値の 消長と 卵胞の 発
現, 発育との 関連については 明確ではなかつた
が, 黄体機能との 関連については 今後の 検討
を待たねばならない。

性周期の 全期間を通じて estradiol-17 β 値は
estrone 値にくらべて かなり 高かったが, 両者
はほぼ 平行して 増減した。同様の 成績は Dob-
son,⁹⁰⁾ Echternkamp & Hansel⁸⁶⁾ により 示されて
いる。また 牛血中には estradiol-17 α ^{がかなり}
_{90, 92~94)} 高濃度で 存在する ことが 認められて いる。本
実験では estradiol-17 α の 分画測定は 実施しな
かった。したがって 溶媒組成ベンゼン : メ
タノール = 85 : 15 の Sephadex LH-20 ミクロカ
ラムフロマトグラフィによる estradiol-17 β

画分に estradiol-17 α が混入する可能性がある。しかし本実験で使用した estradiol-17 β -6 牛血清アルブミン抗血清の estradiol-17 α に対する反応性はきわめて低いので、得られた estradiol 値は明らかに estradiol-17 β と考えられる。estradiol-17 α の動態についても今後検討する必要がある。

2. progesterone

1). 測定法について

progesterone に対する抗血清を作成するための抗原としていくつかのものがあるが、¹¹⁵⁻¹¹⁸⁾ progesterone-3-oxime-牛血清アルブミンを用いて作成した抗血清は特異性の点で優れたものと考えられている。本実験で使用した progesterone-3-oxime-牛血清アルブミンに対する抗血清は4万倍に希釈可能な高カ価のものであった。

た、本抗血清は 5 α -pregnanedione にかなり高い交叉反応を示したが、他のステロイドとの反応性は低く、特異性の高い優れたものであった。収野⁹⁵⁾は progesterone に対して高い特異性を有する抗血清を使用して progesterone 含有量の多い検体について測定する場合にはクロマトグラフィーによる分離精製操作を省略できることを示している。本実験では、クロマト操作を省いた直接法によって測定した牛血中 progesterone の測定値は、クロマト法によるそれとよく一致していた。このことから牛の血中 progesterone の測定には操作が簡単な直接法の応用を推奨することができると考えられる。なおクロマト法、直接法ともに測定下限はほぼ 20 pg であるが、より比放射能の高い progesterone-³H を使用すれば測定感度をさらに高めることが可能であろうと考えられる。

同一血漿を用いて radioimmunoassay 法、第 3 章で示した蛍光法^{76, 96)}および島居らの⁷⁵⁾ competitive protein binding assay 法による progesterone 測定値

と比較した結果、3者はほぼ一致することを認められた。しかし radioimmunoassay 法は蛍光法に比べると操作が簡易で、かつ感度が著しく高く、また competitive protein binding assay 法に比べると特異性、感度ともに高い点で優れている。従って progesterone の測定法としては radioimmunoassay 法が最も優れたものと考えられる。

2). 血中動態について

性周期における牛末梢血中 progesterone については最近 radioimmunoassay 法ならびに competitive protein binding assay 法によって測定した成績が多数報告されているが、^(80~82, 85~89, 97~101)本実験で得られた性周期における progesterone の動態はそれらとほぼ一致することを認められた。すなわち progesterone の消長は発情期に最低値、黄体期（排卵後 11~17 日）に最高値を示し、次の排卵前 4~5 日頃から急激に低下する一峰性を示した。ま

た、Donaldson⁹⁸⁾らは性周期の8日以後 progesterone 値の変動がはげしいことを報告しているが、本実験でもそのような例があることを認めた。排卵前の progesterone の上昇は婦人、猿、その他実験小動物で認められている。⁷²⁾ Ayalon¹⁰³⁾らは牛において発情開始前24時間から48時間の間、4時間ごとの隔で採取した血液について progesterone 濃度を測定した成績を報告し、progesterone は発情開始16時間前に一時的に増加することを報告している。本実験においては1頭の牛を用い、発情開始から54時間後の排卵までの間2時間ごとの隔で採取した血液について progesterone を測定した結果、発情開始後28~36時間の8時間の時間帯、つまり排卵前24~16時間にあたる時期に濃度水準としては軽度ではあるが一過性の progesterone の上昇が認められた。この現象は生物学的測定法による gestagen の排卵前の増加と関連してきわめて興味ある問題である。

3. 17 α -hydroxy-progesterone から ω に 20 β -hydroxy-progesterone

a. 測定法について

牛末梢血中 17 α -hydroxy-progesterone から ω に 20 β -hydroxy-progesterone の微量定量を行なう目的で神戸⁷⁷⁾川原が⁷⁷⁾作製した 17 α -hydroxy-progesterone-oxime-牛血清アルブミンと ω 20 β -hydroxy-progesterone-oxime-牛血清アルブミンに対する抗血清を使用した radioimmunoassay 法について若干検討を加えた。

本実験で使用した 17 α -hydroxy-progesterone から ω に 20 β -hydroxy-progesterone に対する抗血清はそれぞれ 2.5×10^4 倍, 1×10^4 倍に希釈可能な高カ価のものであり, 0 ~ 500 pg の範囲内できわめて優れた標準曲線を描くことが出来た。

17 α -hydroxy-progesterone-oxime 牛血清アルブミン抗血清は他のステロイドとの反応性が全般に低く, 特異性の高いものであった。progesterone

以下の 20α -hydroxy-progesterone には若干交叉反
 応を示したが、溶媒組成ヘキサン：ベンゼン
 ：メタノール = 90：5：5 の Sephadex LH-20
 ミクロカラムクロマトグラフィーによりこれ
 らは完全に分離し得る。

一方、 20β -hydroxy-progesterone-oxime-牛血
 清アルブミン抗血清は、progesterone 以下の
 20α -hydroxy-progesterone に対してわずかに交叉し
 たが、他のステロイドとの反応はきわめて低
 く、progesterone に対してはクロマトグラフィー
 により分離することが出る、また 20α -hydroxy
 -progesterone は牛に於いてその存在が認められ
 ていないところから測定精度に影響を与える
 ことはないものと考えられる。

なお 17α -hydroxy-progesterone, 20β -hydroxy-proges
 -terone とともに測定下限は 20 pg であったが、より
 比放射能の高い ^3H 標識ホルモンを使用すれば
 測定感度をさらに高めることが可能になるも
 のと考えられる。

b. 血中動態について

Strott¹⁰⁴⁾らは婦人の月経周期に比ける 17α -hydroxy-progesterone について一性周期の間に黄体期と卵胞期に2つのピークを形成することを示している。すなわち黄体期に比けるピークは黄体機能を反映し、卵胞期に比けるそれは卵胞の成熟と関係があるものと考えられている。Kazama⁷²⁾および Hansel は発情開始から排卵までの間、6時間ごとに採取した血液材料について progesterone を測定して、この時期には progesterone の増加が認められないことから、発情期に比ける gestagen の分泌相を知るためには、progesterone 以外に 20β -hydroxy-progesterone および 17α -hydroxy-progesterone などの性ステロイドについての知見を得ることが必要であろうと強調している。しかし性周期に比ける牛血中 17α -hydroxy-progesterone, 20β -hydroxy-progesterone の消長について検討した報告はみられない。本実験においては、発情開始から54時間後

の排卵までの間、2時間々隔で採取した血液に於いて 20β -hydroxy-progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone と測定したところ、前者はこの期間中全般に低値で経過したが、 17α -hydroxy-progesterone には特徴的な増減が認められた。

すなわち 17α -hydroxy-progesterone は発情開始時には測定感度以下で検出し得なかつたが、発情開始後 40~42 時間の時間帯、排卵前 12~14 時間にあたる時期にきわめてシャープなピークを形成した。排卵直前に比ける 17α -hydroxy-progesterone のサージともみられる明瞭なピーク形成について、それが婦人の卵胞期にみられるピークに相当するものか否か、その生理的意義、排卵との関連あるいは分泌源などは現在明らかではないが、きわめて興味ある事実が示されたものと思考される。

第4節 小 括

牛体液中の estrogen, progesterone, 20β -hydroxy-progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone を測定する目的で radioimmunoassay 法を導入し、測定法に若干検討を加え、これにより性周期に比けるこれからホルモンを分画測定し、次の成績を得た。

1. 経産牛6頭の性周期に比ける血中 estrogen, estradiol- 17β の消長は全期間を通じてほぼ同じ傾向を示し、estradiol- 17β は estrone にくらべて高値であった。総 estrogen 値 (estrone + estradiol- 17β) は6頭中3頭では排卵後に低値 (5.4~6.0 pg/ml) を示し、黄体期の3~12日にかけてピーク (9.0~10.5 pg/ml) を形成したのち、次回の排卵3~1日前に3.5~5.5 pg/ml の鋭いピーク (10.6~19.5 pg/ml) を形成した。残りの3頭では黄体期に明瞭な estrogen のピークを形成しなかった。しかし次回の排卵2~1日前には

いずれも鋭く、かつ高いピーク (12.7 ~ 20.0 pg/ml) を形成した。

2. progesterone-3-oxime 牛血清アルブミンを用いて作成した抗血清は適正希釈倍数 40,000 倍の高力価のものであった。本抗血清を用いて作成した標準曲線は、progesterone が 0 ~ 400 pg の範囲においてほぼ直線 (片対数目盛方眼紙使用) を示し、0 pg における結合率は 70% 以上であった。さらに本抗血清の各種ステロイドに対する交叉反応は 5 α -pregnandione を除いて低く、progesterone に対する特異性はきわめて高いことを認めた。

3. progesterone の抽出過程において、粗抽出物をフロマトを用いて精製する方法 (フロマト法) ならかに、この操作をはずした方法 (直接法) によって得られた材料について progesterone の測定値を比較した結果、いずれの方法においてもほぼ等しい値が得られた。

4. 性周期の各時期の牛血液について、radioimmunoassay 法、蛍光法、および competitive protein binding assay 法により測定した progesterone の値を比較した結果、3者はほぼ等しいことを認めた。

5. radioimmunoassay 法により延13性周期の牛血中 progesterone の消長を検討したところ、progesterone は発情期に最低値 $0.2 \sim 0.3 \text{ ng/ml}$ 、黄体期（排卵後 11 ~ 17 日）に最高値 $1.8 \sim 5.8 \text{ ng/ml}$ と示し、次の排卵前 4 ~ 6 日頃から急激に低下することを認めた。

6. 発情開始から排卵までの間、2時間々隔で採取した1頭の牛の血液について progesterone を測定した結果、排卵前 24 ~ 16 時間にあたる時期に明瞭な一過性の上昇が認められた。

7. 血中 17α -hydroxy-progesterone ならびに

20β -hydroxy-progesterone は性周期の 7~8 日頃および次の排卵 5 日前にあたる 14 日目にピークを示した。

8. 発情期において 20β -hydroxy-progesterone には特異的な変動は認められなかったが、 17α -hydroxy-progesterone は排卵前 12~14 時間のごく短時間にきわめてシャープなピークを形成した。

第5章 妊娠初期における estrogen, progesterone, 17 α -hydroxy-progesterone および 20 β -hydroxy-progesterone の動態
—とくに radioimmunoassay法による検討—

緒言

第2, 3, 4章においては各種の性ステロイド測定法によって正常性周期における牛末梢血中 estrogen ならびに gestagen の動態を明らかにした。

estrogen および gestagen は多くの哺乳動物において妊娠の維持に必須のホルモンであることが知られている。しかし牛における妊娠初期の二つらホルモンの動態を追究した報告は少なく、とくに 20 β -hydroxy-progesterone および 17 α -hydroxy-progesterone に関する報告は皆無である。

本章では授精後 31~32日までの妊娠初期と正常に経過した牛について estrogen, progesterone,

20 β -hydroxy-progesterone とよび 17 α -hydroxy-progesterone の動態を追究した。

第1節 実験材料ならびに方法

1. estrogen の測定

1). 試薬, 器具, 抗血清および測定方法.

本実験に使用した試薬, 器具, 抗血清ならびに estrogen の測定法は第4章に記述した radioimmunoassay 法に準拠した。

2). 実験牛および血液材料

供試牛は黒毛和種経産牛3頭およびホルスタイン種経産牛2頭を含む5頭である。血液材料は2~6日の間隔で頸静脈から採取したヘパリン血総計74例で採取後血漿と分離して

測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。

2. progesterone の測定

1) 試薬, 器具, 抗血清および測定方法

本実験に使用した試薬, 器具, 抗血清ならびに progesterone 測定法はオ4章に記載した radioimmunoassay 法に準拠した。

2) 実験牛らび血液材料

供試牛らびに血液材料の採取, 保存法ならびに材料数は前項と同様である。

3. 17α -hydroxy-progesterone ならびに 20β -hydroxy-progesterone の測定

1) 試薬, 器具, 抗血清および測定方法

本実験に使用した試薬, 器具, 抗血清なら
びに 17α -hydroxy-progesterone, 20β -hydroxy-progesterone
測定法は第4章に記述した radioimmunoassay 法
に準拠した。

2) 実験牛および血液材料

供試牛は第1, 2項で記述した5頭のうち
の1頭でホルスタイン種経産牛である。血液
材料は1~3日の間隔で頸静脈から採取した
ヘパリン血統計16例で採血後血漿を分離して
測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。

第2節 実験成績

1. 妊娠初期における estrogen の動態

妊娠牛 5 頭の排卵後 31~32 日までの妊娠初期における estrogen の動態を図 5-1-1 および図 5-1-2 に示した。

estrone, estradiol-17 β が排卵後 31~32 日までの観察期間を通じて認められた。すなわち estradiol-17 β の値は estrone にくらべてかなり高い濃度水準を示したが両者はほぼ平行して増減した。この際 estriol はほとんどの例で検出できなかったが検出されたものでもその測定値には特徴的な変動が認められなかった。従って本実験では estriol についての成績は削除した。

estrogen の濃度水準ならびに消長は個体によりかなり大きな差異があることを認めた。すなわち総 estrogen は 5 頭中 2 頭 (Nos. 121, 125) で排卵後 5 日目に一時的な高値 (12.4 および 7.2 pg/ml) を示したが他は 12 日頃まで比較的低値 (2.3~6.0 pg/ml) で経過した。その後 estrogen 値は漸次増加の傾向を示し、27~28 日以降はかなり高い値 (6.2~11.6 pg/ml) を示した。

2. 妊娠初期における progesterone の動態

妊娠牛 5 頭の排卵後 31~32 日までの妊娠初期における progesterone 値の動態を図 5-2-1 および図 5-2-2 に示した。

progesterone 値は排卵後急激に上昇して、11~12 日目には $4.3 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ に達し、妊娠 31~31 日にはさらに高値 ($6.0 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$) を示した。また progesterone の濃度水準ならびに消長は個体により若干差異があること、とくに排卵後 20 日前後に変動が激しいことが認められた。従って排卵後 11~12 日までの妊娠初期の progesterone 値が、性周期における同時期のそれにくら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が注目された。

3. 妊娠初期における 17α -hydroxy-progesterone

ならびに 20β -hydroxy-progesterone の動態

Fig. 5-1-1. Peripheral plasma estrogens levels of cows in early pregnancy

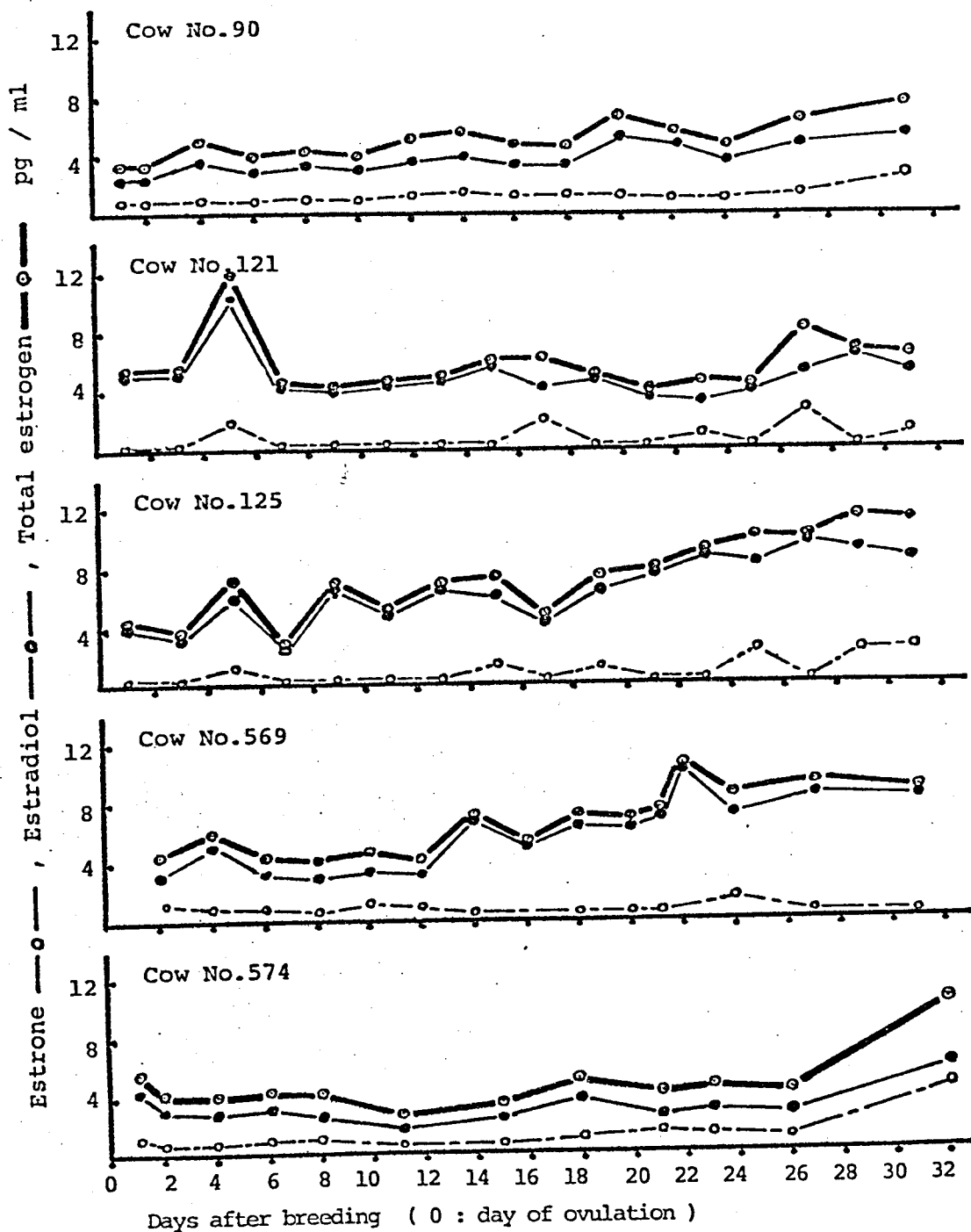


Fig.5-1-2. Peripheral plasma estrogen levels of cows in ealy pregnancy

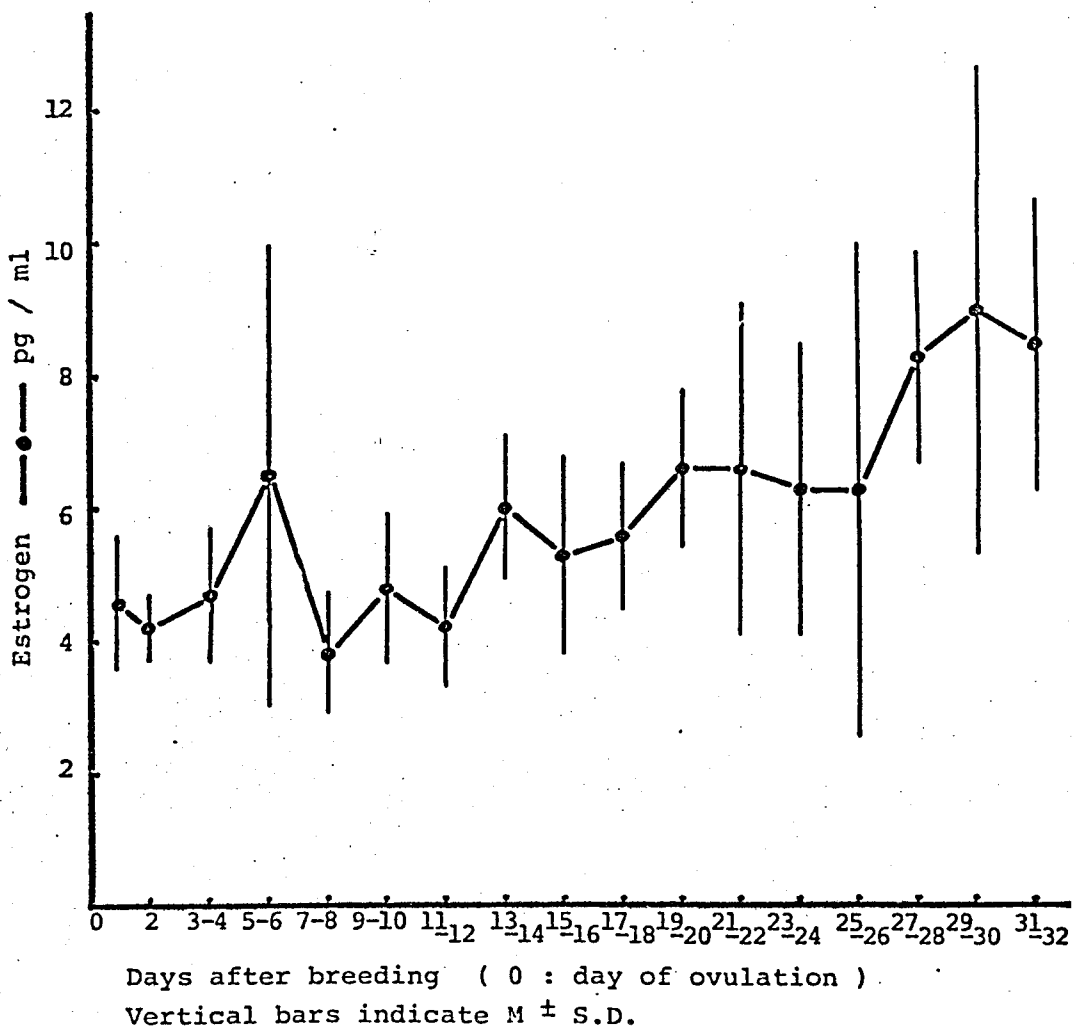


Fig.5-2-1. Peripheral plasma progesterone levels of cows in early pregnancy

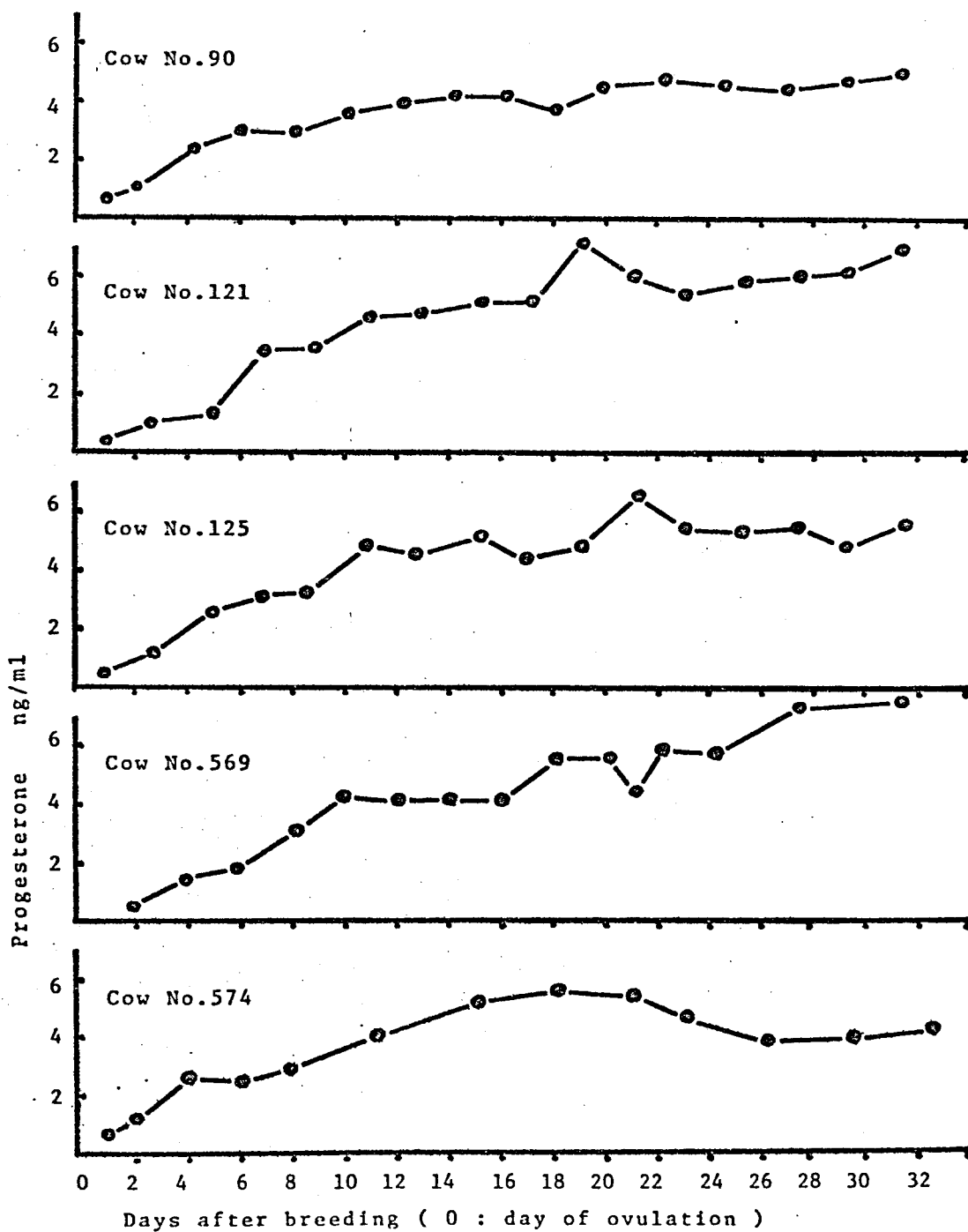
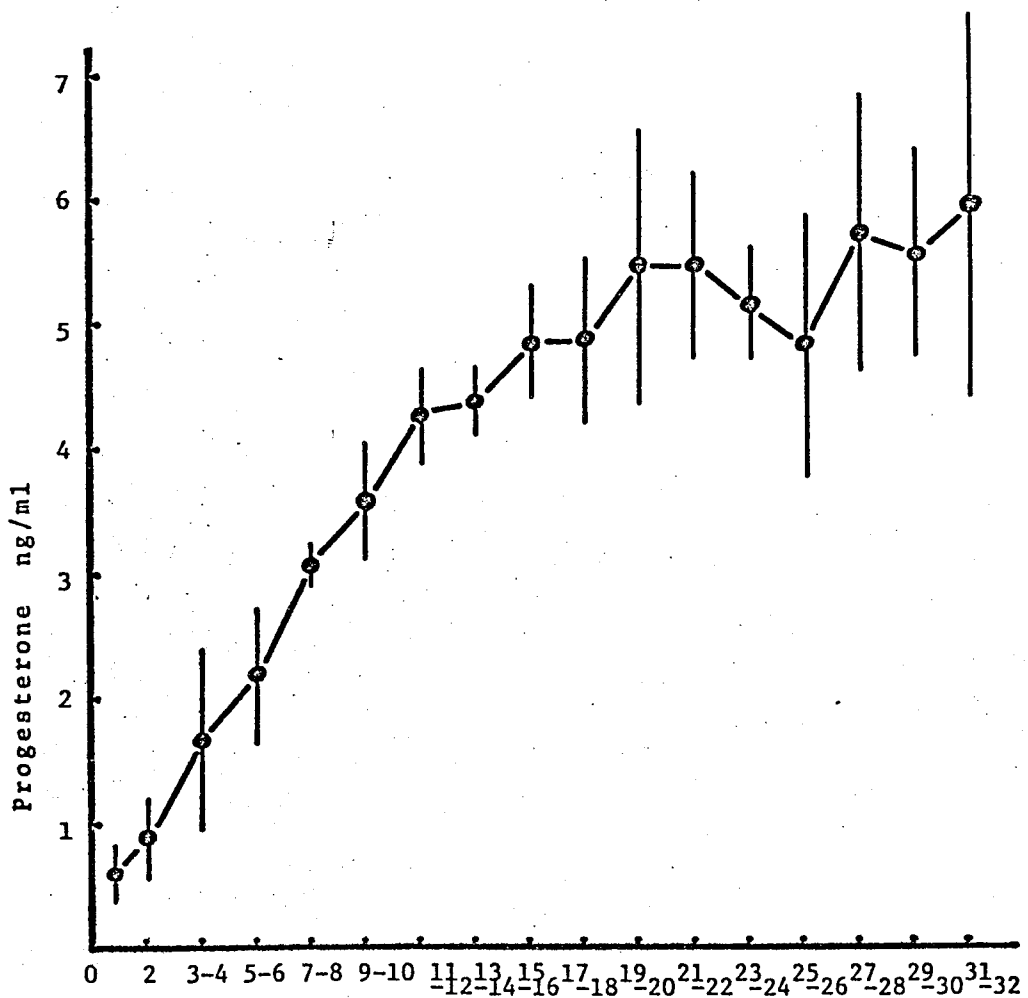


Fig. 5-2-2. Peripheral plasma progesterone levels of cow in early pregnancy



Days after breeding (0 : day of ovulation)
Vertical bars indicate $M \pm S.D.$

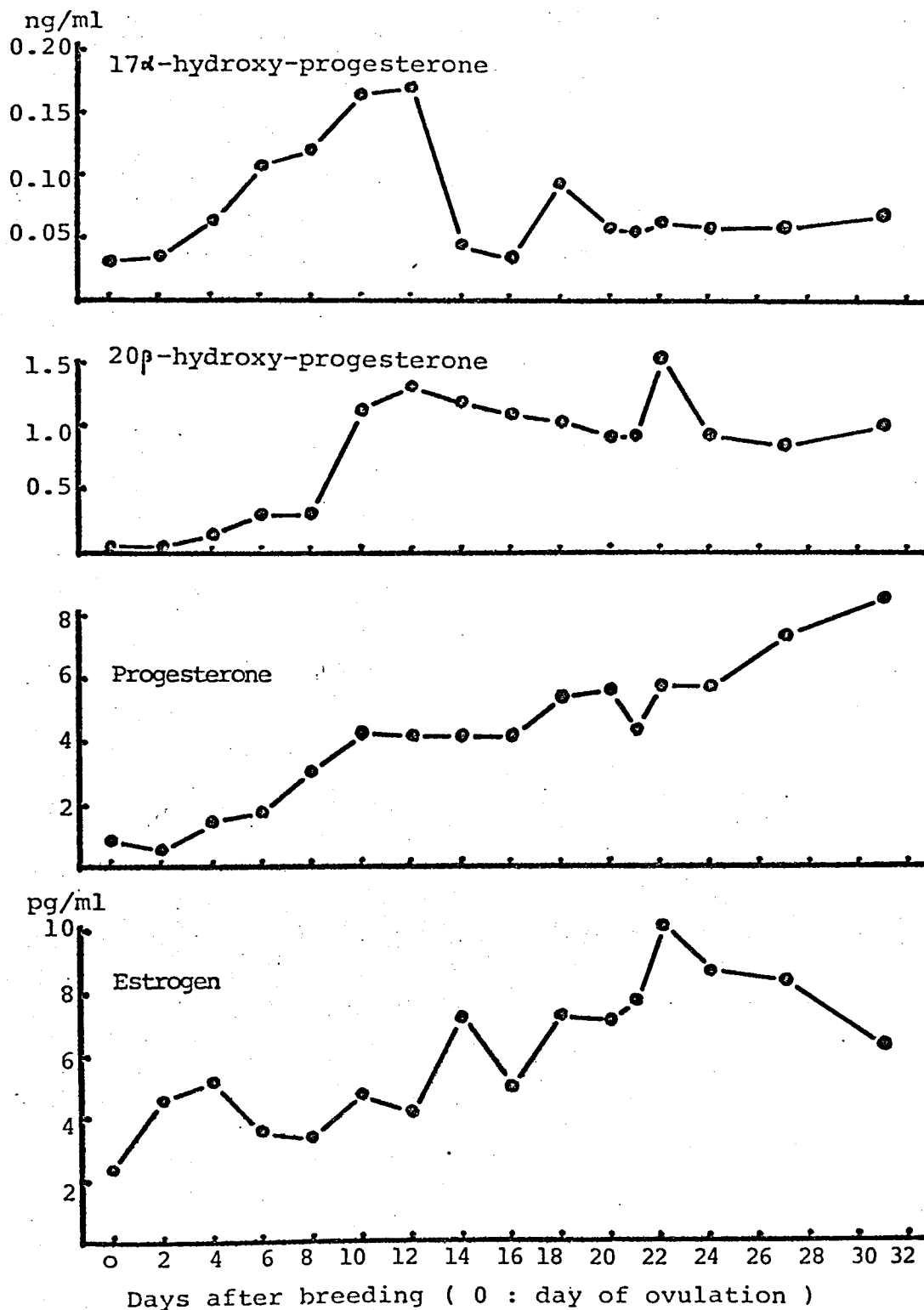
Table 4-3-5. Peripheral plasma progesterone, 20 β -hydroxy-progesterone, 17 α -hydroxy-progesterone and estrogen concentrations in a cow during the early pregnancy

Days after breeding	Progesterone	20 β -hydroxy-progesterone	17 α -hydroxy-progesterone	Estrogen*
	ng/ml	ng/ml	pg/ml	pg/ml
0**	0.9	0.03	30.0	2.4
2	0.6	0.03	35.0	4.6
4	1.5	0.15	63.7	5.2
6	1.8	0.32	108.3	3.6
8	3.1	0.36	122.5	3.4
10	4.3	1.13	165.3	4.8
12	4.2	1.33	171.2	4.2
14	4.2	1.19	45.0	7.2
16	4.2	1.10	35.6	5.0
18	5.5	1.03	97.5	7.3
20	5.7	0.93	59.1	7.2
21	4.4	0.95	56.0	7.8
22	5.9	1.55	64.3	10.2
24	5.8	0.96	60.5	8.7
27	7.4	0.88	61.3	8.4
31	8.6	1.01	71.5	6.3

* Estrogen : estrone + estradiol

** 0 : day of ovulation

Fig.5-3-1. Steroid concentrations in peripheral plasma of cow in early pregnancy



妊娠牛1頭の 17α -hydroxy-progesterone はらわに 20β -hydroxy-progesterone の動態と ^(表 5-3-1 および) 図 5-3-1 に示した。ニから両ステロイドは排卵後 12 日目までは progesterone とほぼ同様に増加した。しかし、 17α -hydroxy-progesterone は 12 日目と 10^{-7} (0.17 ng/ml) として急激に減少し、その後は比較的的低値 ($0.03 \sim 0.09 \text{ ng/ml}$) で経過するニことが認められた。一方、 20β -hydroxy-progesterone は 12 日以降もその値 ($0.90 \sim 1.55 \text{ ng/ml}$) と持続した。

第3節 考 按

1. 妊娠初期における estrogen の動態

妊娠初期の牛血中 estrogen の消長に ^{82, 87)} ついて詳細に検討した報告は数少ない。Henricks ら、¹⁰⁵⁾ Wettman らは血中 estrogen 値を radioimmunoassay 法で測定した結果、妊娠初期の血中 estrogen

値は全般に低値であると述べている。しかし
 Glencross⁸⁸⁾らは妊娠牛においても性周期の黄体
 期にしばしば見られると同様に血中 estrogen
 値が授精後5~6日頃から増加することを報
 告し、Randel^{19,20)}らは受胎牛ならびに不受胎牛の
 尿中 estrogen 値を化学的測定法により測定し
 比較したところ受胎牛は不受胎牛にくらべ低
 いことを認めている。

本実験においては、正常に妊娠初期を経過
 した牛5頭のうち2頭では血中 estrogen 値は
 排卵後5日目に一時的な高値を示したが、他
 の牛では12日目頃までは全般に低値で経過し
 、その後は漸次増加する傾向を認めた。これ
 らの授精後数日~10数日の妊娠初期における
 血中 estrogen 値は一般に低いものと理解される
 が、たとえ高い場合があってもその程度が軽
 く、かつ一過性であれば妊娠が維持され
 る可能性が示唆された。

2. 妊娠初期における progesterone の動態

progesterone は子宮内膜に妊娠前期性の変化を招来させ、かつ妊娠の維持に与かる性ホルモンである。

本実験においては正常に妊期を経過した5頭の牛について排卵後31~32日までの妊娠初期の末梢血中 progesterone の動態を検討した結果、progesterone 値は排卵後急激に上昇して11~12日頃にはかなり高値に達し、妊娠31~32日にはさらに増加する傾向が認められた。この progesterone 値の増加速度、あるいは濃度水準は性周期に比けるそれと比べてやや高いように思われた。この点は radioimmunoassay あるいは competitive protein binding assay による従来(82,88,90,100,105)の報告とはやや趣きを異にしてゐるが、今後さらに追求する必要がある。

3. 妊娠初期における 17 α -hydroxy-progesterone

なら 17α - 20β -hydroxy-progesterone の動態

progesterone, 20β -hydroxy-progesterone および 17α -hydroxy-progesterone は "す" かも黄体, 副腎あるいは胎盤から分泌されると考えられている。このうち 20β -hydroxy-progesterone および 17α -hydroxy-progesterone は gestagen の生物学的測定法である Hooker-Forbes 法に於いて強い陽性反応を示すが, 体内に於ける生理活性は弱いと認められている。

妊娠初期に於ける牛末梢血中のこれら両ステロイドホルモンの動態を検討した報告は "またみられな" が, 本実験に於いては, 20β -hydroxy-progesterone は progesterone とほぼ同様なパターンで経過し, 17α -hydroxy-progesterone は 12 日とピークに急激に減少し, その後は比較的低値で経過することが認められた。 17α -hydroxy-progesterone の急激な減少は標的臓器である子宮内膜あるいは分泌源に於けるステロイド代謝酵素の変化によるものであろうと考

水子か、この生理的意義については明らかでない。

第4節 小 括

授精後 31~32 日の妊娠初期牛 5 頭において末梢血中 estrogen, progesterone, 20β -hydroxy-progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone を radioimmunoassay 法により測定して次の成績を得た。

1. estrogen 濃度は estrone は estradiol- 17β に比べて低く、総 estrogen (estrone + estradiol- 17β) は 2 頭では授精後 5 日目に一時的に高値 (12.4 及び 7.2 pg/ml) を示し、他の 3 頭では 12 日頃まで低値 (2.3 ~ 6.0 pg/ml) で経過し、その後漸次増加した。

2. progesterone 濃度は排卵後急激に上昇し

て 11 ~ 12 日目にはかなり高値 ($4.3 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$) に達し, 31 ~ 32 日にはさらに増加 ($6.0 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$) することが認められた。

3. 20β -hydroxy-progesterone は progesterone とほぼ同様に消長したが, 17α -hydroxy-progesterone は排卵後 12 日まで 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が認められた。

第6章 リポートブリーダーにおける授
精前後、妊娠初期の末梢血中 estrogen および
gestagen の動態

—とくに生物学的測定法による検討—

緒言

リポートブリーダーの不受精卵の主な原因は
胚の早期死滅であると考えられており、その
誘因としてホルモンの分泌異常は最も重視さ
るべきものである。本研究の第2章ないし第
5章では正常性周期ならびに妊娠初期におけ
る牛の末梢血中 estrogen および gestagen の動態を
明らかにした。

本章では牛リポートブリーダーにおける受
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を究明する目的で、授精
前後から妊娠初期の血中 estrogen および ges-
tagen の動態を検討した。

第1節 実験材料ならびに方法

1. 供試牛

供試牛は羊令7~19才(平均12才)の黒毛和種経産牛11頭で、試験牛として導入するまで農家に繁殖牛として飼育されてきたものである。このうち9頭(Nos. 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 41, 48)は過去に3回ないし9回の授精を受けて受胎しなかったリポートブリーダーで、他の2頭(Nos. 42, 45)は正常繁殖牛(過去の授精回数1回)である。これらの牛は導入後少なくとも、一性周期の間、臨床繁殖検査によって観察して、膣、子宮、卵巢の所見に異常がないことを確認した上で授精試験に供された。授精は卵胞の発育状態ならびに膣所見から判断して最適期と思われる時期に1~2回実施した。精液は兵庫県畜産試験場但馬分場から分与された液状精液である。

2. 生殖器の検査

11頭中10頭については授精後15~28日の間に屠殺解剖して、胎芽の存在および発育状態を検査した。これらの生殖器については卵管の通気性検査および細菌検査も行なった。細菌検査は血液寒天およびPPL0培地も使用して、直接および増菌培養法によつて行なった。残りの1頭(No. 45)は授精後黄体が存続して、直腸検査によつて妊娠が確認されたので70日目まで解剖を行わずに観察を続けた。

3. 血液材料ならびに性ステロイドの測定法

性ステロイドの測定に用いた血液材料は、発情開始前から屠殺解剖当日まで、連日あるいは2日の間隔で頸静脈から採取したフエン酸ソーダ加血液である。血漿の分離は採血後直ちに行ない、測定時まで -20°C の冷蔵庫に

保存した。

性ステロイドの測定は第2章で述べた生物学的測定法により, estrogen については Sulman 法, gestagen については Hooker-Forbes 法に準じて行った。

第2節 実験成績

1. 生殖器の検査

リポートブリーダー9頭中8頭 (Nos. 34, 33, 39, 41, 35, 31, 32, 38) の子宮内には発育中の胚, あるいはこれの変性崩壊した痕跡が全く認められなかった。子宮粘膜の肉眼的所見に依りても, 全例とも異常がみられず, 卵管の疎通性も正常であった。また卵巢には排卵を確認した位置にそれぞれ黄体が存在していた。また生殖器各部位 (卵管, 子宮, 膈) からは病原性細菌は検出されなかった。残りの

1 頭 (No. 48: 授精後 28 日目に屠殺解剖) の子宮内には老性した胎膜と死亡した胚が認められた。この胎膜は長さ 38 cm で正常であったが、紐状で両端共に先端から $\frac{1}{5} \sim \frac{1}{6}$ の部位で切れ、かつきわめて脆弱であった。また胚を包んだ羊膜は破れた絨毛膜から露出し、直接子宮壁に接していた。胎膜の血管発達はずがに認められたが、胚の胎長は 4.5 mm で胎令に比べて小さかった。なお子宮粘膜には異常はなく、卵巣には退行しつゝある黄体および直径 10 mm の卵胞 1 個が存在していた。

正常牛 2 頭のうち、授精後 28 日目に解剖した 1 頭 (No. 42) の子宮内には、正常に発育しつゝあるとみられる胚が存在していた。本例の胎膜は全長約 36 cm、最大部の直径は約 2 cm で、不妊角まで延びており、血管の発達、走行は明瞭であった。胚の胎長は 7 mm で胎令に応じた正常な発育を示していた。卵巣には妊娠黄体ならぬに直径 10 mm の卵胞 2 個が存在していた。他の 1 頭 (No. 45) は授精後 70 日

まで正常に妊娠が進行していった。

2. 授精前後の血中遊離性ステロイドの消長

1) estrogen

a) 胎が存在しなかった例(図6-1) :

剖検時に子宮内に胎が存在しなかった8頭の血中遊離estrogen値は、発情期にいずれも最高値(4.45~8.90 $\mu\text{g/l}$)を示した。このピーク形成時期は個体によりかなり差があり、排卵前3日から排卵直後にわたっていた。さらに排卵後のestrogen値低下の時期も同様に個体によりかなり異なり、排卵直後から3日目にわたっていた。

黄体期におけるestrogen値は8頭中3頭(Nos. 31, 32, 38)では黄体の発育に伴って、殆ど増加しないうで排卵直後の低い値を維持するか、あるいはわざわざ増加したに過ぎなかった。

他の5頭 (Nos. 33, 34, 35, 39, 41) の estrogen 値は排卵後4日頃から増加して, 7~13日頃に明瞭なヒコ-7 ($3.34 \sim 6.67 \mu\text{g/L}$) を形成した。

5 b). 死亡胚が存在した例 (図6-2) : 授精後27日に子宮内に死亡胚が存在していた牛 No.48 の estrogen 値は, 排卵前2日に最高値 ($8.90 \mu\text{g/L}$) を示し, 排卵直後に急激に低下 ($0.84 \mu\text{g/L}$) した。その後 estrogen 値は授精後10 4日までは低値 ($0.42 \sim 0.86 \mu\text{g/L}$) を保ったが, 7日から増加 ($3.34 \mu\text{g/L}$) して13日には最高値 ($4.45 \mu\text{g/L}$) を示した。この値を授精後27日の解剖時まで維持したが, 16~19日の間に, 一時的に著しい減少 ($1.67 \mu\text{g/L}$) を示した。

15 c). 正常胚が存在した例 (図6-2) : 授精後28日に子宮内に正常に発育しつつある胚が存在した牛 No.42 の estrogen 値は, 排卵前2~3日に最高値 ($6.67 \mu\text{g/L}$) を示し, 排卵直後20 には急激に低下した。その後は授精後28日の

屠殺解剖時まで $0.10 \sim 1.12 \mu\text{g/L}$ の低値を継続した。授精後70日まで正常に妊娠を維持した牛 No. 45 の estrogen 値は、排卵前2日に最高値 ($3.34 \mu\text{g/L}$) を示し、排卵前日には $2.33 \mu\text{g/L}$ 、排卵直後には $0.21 \mu\text{g/L}$ と急激に減少した。授精後70日までには、牛 No. 42 と同様に estrogen 値は著しく増加することなく、低値 ($0.56 \sim 1.67 \mu\text{g/L}$) を維持した。

2). gestagen

血中 gestagen 値は発情期には estrogen のピーク形成時期にほぼ一致して、あるいは若干遅れてわずかに増加し、排卵後の発情後期に最低値を示した。黄体期における gestagen の増加の状態は、個体間あるいは不受胎牛と受胎牛との間に著しい差違がみられた。

a). 胚が存在しなかった例 (図6-1) :

解剖時に子宮内に胚が存在しなかった8頭の

うち5頭 (Nos. 33, 34, 35, 39, 41) は、発情期および授精後の黄体期に高い estrogen 値を示した例である。これらのうち No. 39 を除く4頭の gestagen 値は発情期に低い (明瞭なピーク (4.00 ~ 10.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を形成した。黄体期に比べてこれらの5頭の gestagen 値は、排卵後3~4日ごろから増加して、6~16日の間に最高値を示し、10~17日から低下した。最高値は7.5 ~ 16.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で個体間に著しい差がみられた。発情期に比べて gestagen の最高値は黄体期に比べてそれと比べると若干低い (が、排卵後の最低値に比べるとかなり高い値であった。牛 Nos. 31, 32, 38 の3頭は授精後の黄体期の estrogen 値が低い例であるが、gestagen 値も黄体期に著しい増加がなく、低い値 (2.67 ~ 8.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を示した。なお、これらの発情期に比べて gestagen のピークはきわめて軽度であった。

b). 死亡胚が存在した例 (図 6-2) : 子宮内に死亡胚の存在していた牛 No. 48 は、発

情期に於ける estrogen のピーク形成時期より若干遅れて gestagen の軽度のピークを形成した。授精後の黄体期に於ける gestagen 値は、10~13日にかけてわずかに増加 ($2.67 \mu\text{g}/\text{ml}$) したが、16~21日にかけてはむしろ減少 ($1.00 \sim 1.33 \mu\text{g}/\text{ml}$) して、その後ふたたび増加 ($5.3 \mu\text{g}/\text{ml}$) した。しかし27日目の解剖時にはふたたび低値 ($2.67 \mu\text{g}/\text{ml}$) を示した。本例の黄体期に於ける gestagen のレベルが後述の正常妊娠牛2頭のそれと比較するとかなり低く、かつ不安定な消長を示したことが注目された。

c). 正常胚が存在した例 (図6-2) :

正常妊娠牛2頭 (Nos. 42, 45) はともに発情期に明瞭な gestagen のピークを示した。gestagen のピーク形成時期は No.42 では estrogen のそれより一日遅れて排卵前2日であったが、No.45 では estrogen のピーク形成時期より約2日遅れて排卵直後であった。黄体期には2頭ともほぼ同様の消長型を示した。すなわち gestagen

値は排卵後4日目頃から10~13日にかけて漸増(5.3~8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)し、その後も28~35日までの観察期間中逐次増加を続けた。

3. estrogen ならびに gestagen の消長と受胎性との関係

実験牛11頭について、発情期ならびに授精後の黄体期における estrogen および gestagen の消長の特徴を一括して表6-1および図6-3に示した。受胎牛3頭の発情期における estrogen 値は、排卵前3~2日に最高値に達し、排卵後は最低値を示したが、不受胎牛8頭では、これと同じものは認められなかった。すなわち estrogen が最高値に達する時期は2頭では排卵前3および2日であったが、6頭では排卵前日ないし排卵当日で、妊娠牛のそれより遅れであった。さらに最低値に達する時期は排卵後1~3日で妊娠牛のそれよりも遅れるこ

とが注目された。発情期における gestagen の
 ピークは受胎牛3頭ならぬに不受胎牛8頭中
 6頭において明瞭に認められた。しかしピー
 クの大きさおよび形成時期は、受胎牛と不受
 胎牛との間に特に著しい差異はみられなかつ
 た。授精後の黄体期における gestagen の消長は
 不受胎牛では全般に estrogen の消長とほぼ同じ
 傾向を示して増減した。すなわち低 estrogen レ
 ベルの牛 Nos. 31, 32, 38 では低～中 gestagen レ
 ベルを示し、高 estrogen レベルの牛 Nos. 33, 34, 35,
 39, 41 では高～中 gestagen レベルを示した。
 いっぽう受胎牛における授精後の黄体期に於
 ける gestagen の消長は、estrogen の消長とレベ
 ルにおいて対照的であった。すなわち、正常
 妊娠牛 Nos. 42, 45 では低 estrogen, 中 gestagen
 レベルを示した。これに對して子宮内に死亡
 胚が存在した牛 No. 48 においては、高 estrogen
 , 低 gestagen レベルを示した。受胎牛3頭の
 授精前後の gestagen と estrogen との比率 (G/E, $\mu\text{g}/\text{ml}$)
) を図 6-4 に示した。正常妊娠牛の G/E は

豚が死亡した牛のそれに比べて明らかに高か
つた。

5

10

15

20

Fig.6-1. Levels of plasma estrogen and gestagen in infertile cows following insemination

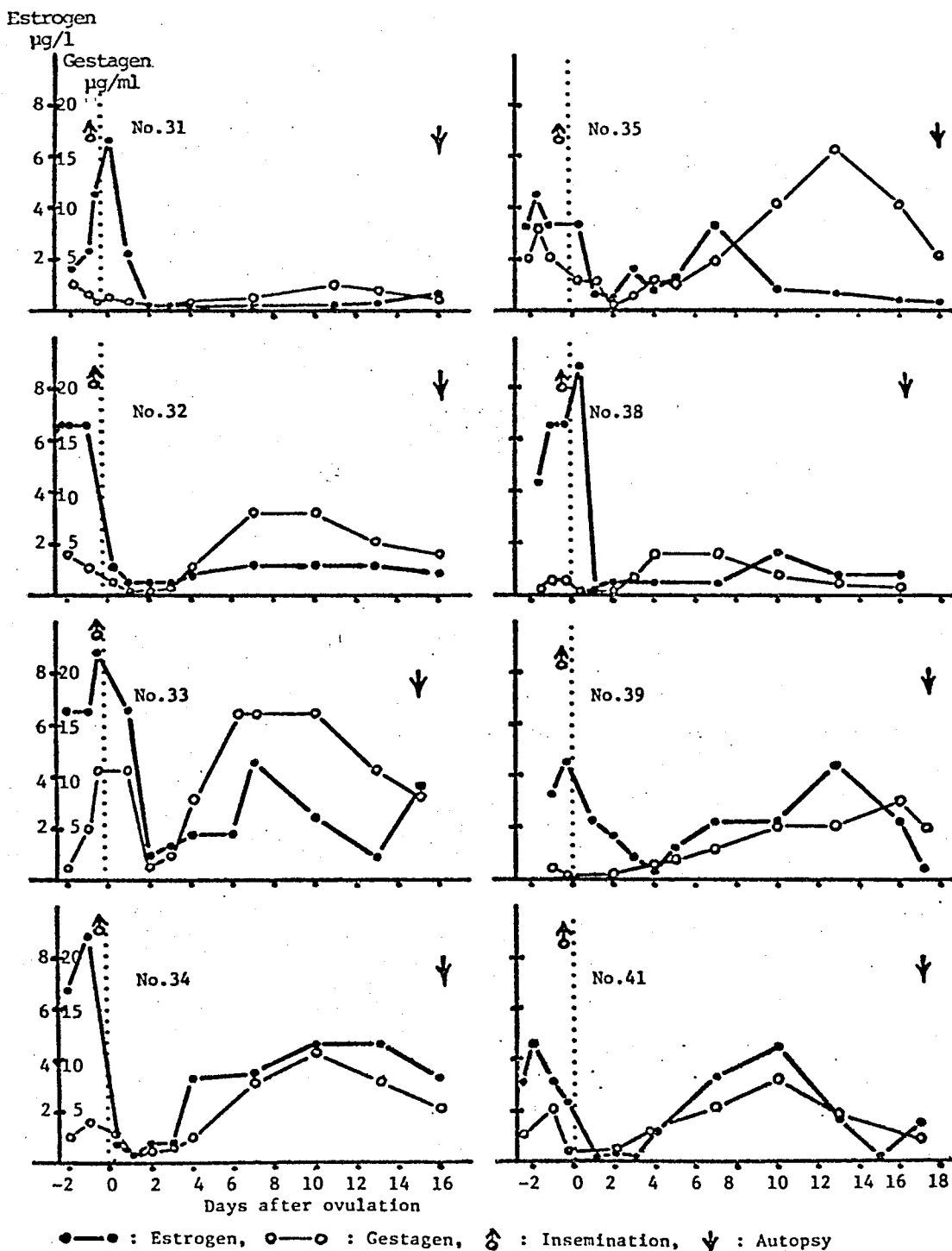


Fig.6-2. Levels of plasma estrogen and gestagen in cows during early pregnancy

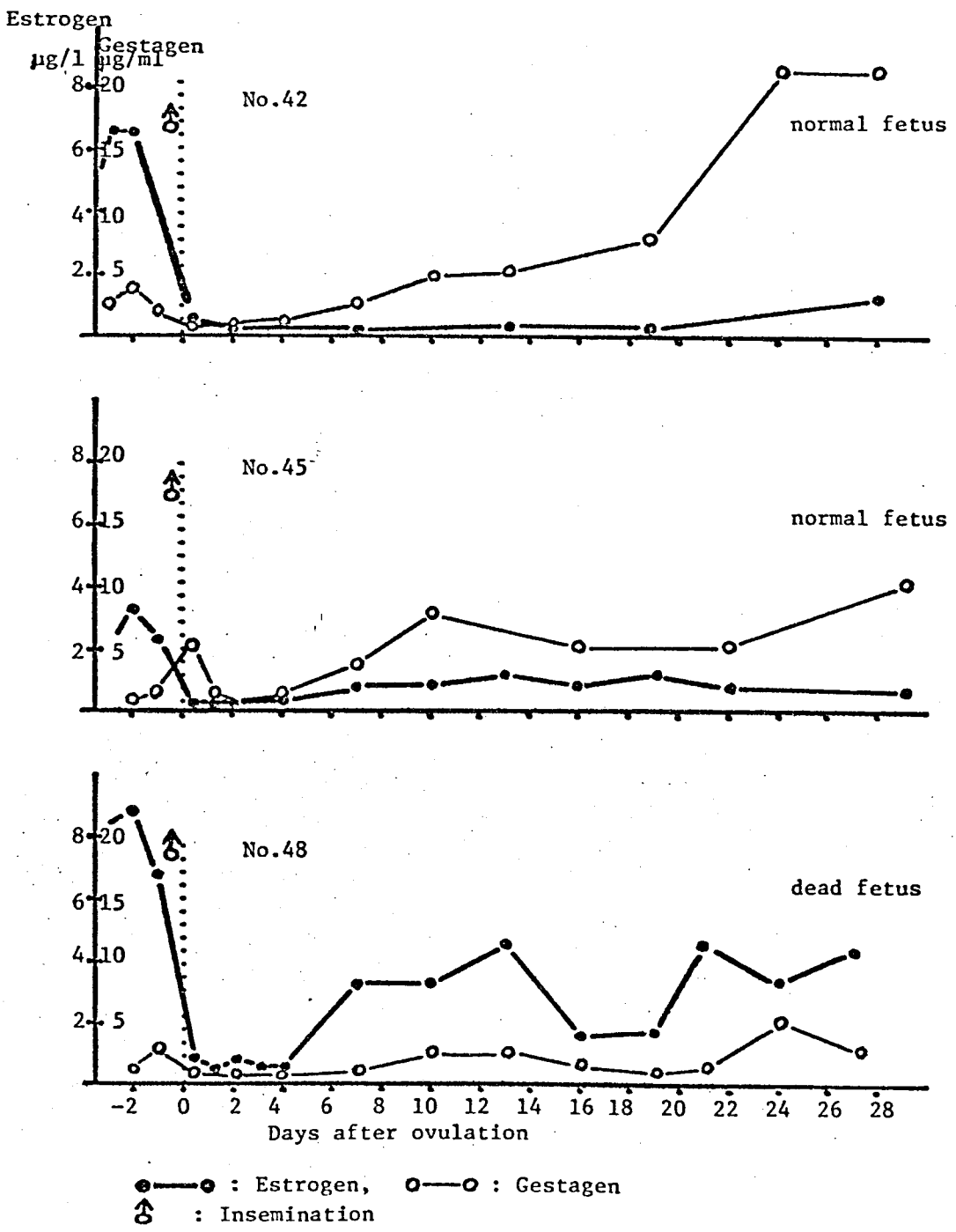
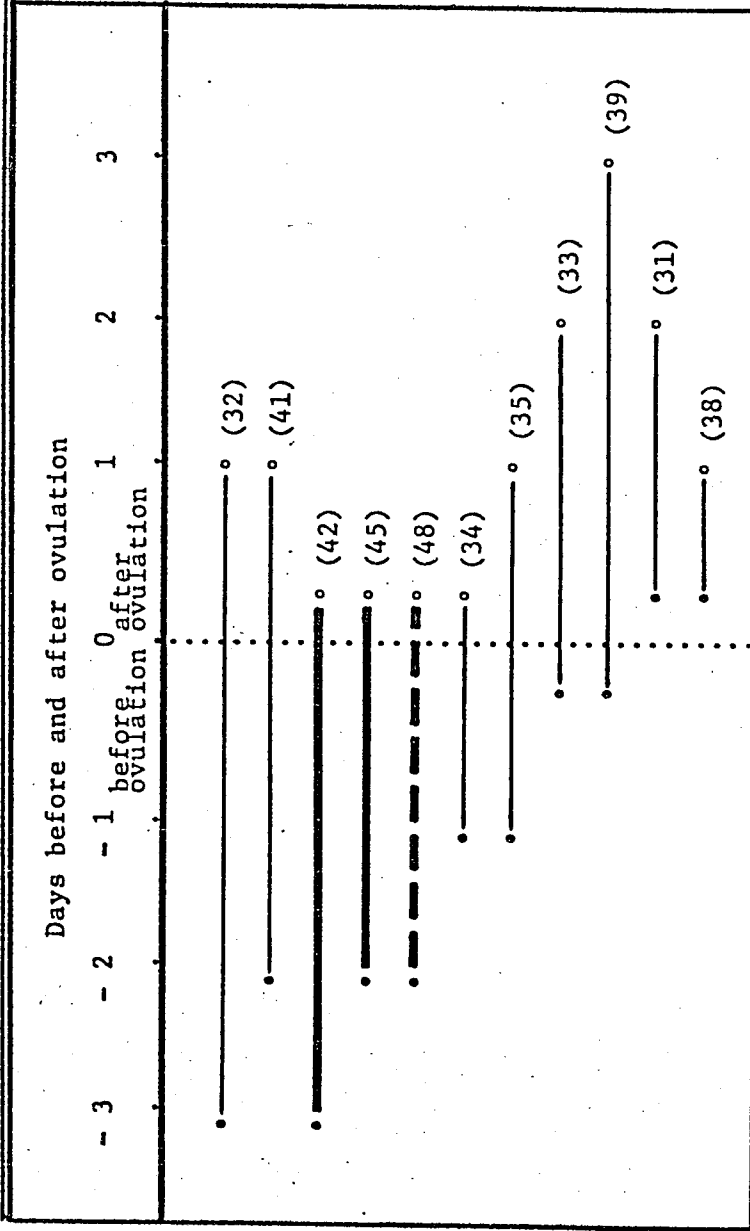


Fig.6-3. Differences in time at highest and lowest plasma level of estrogen before and after ovulation between fertile and infertile cows



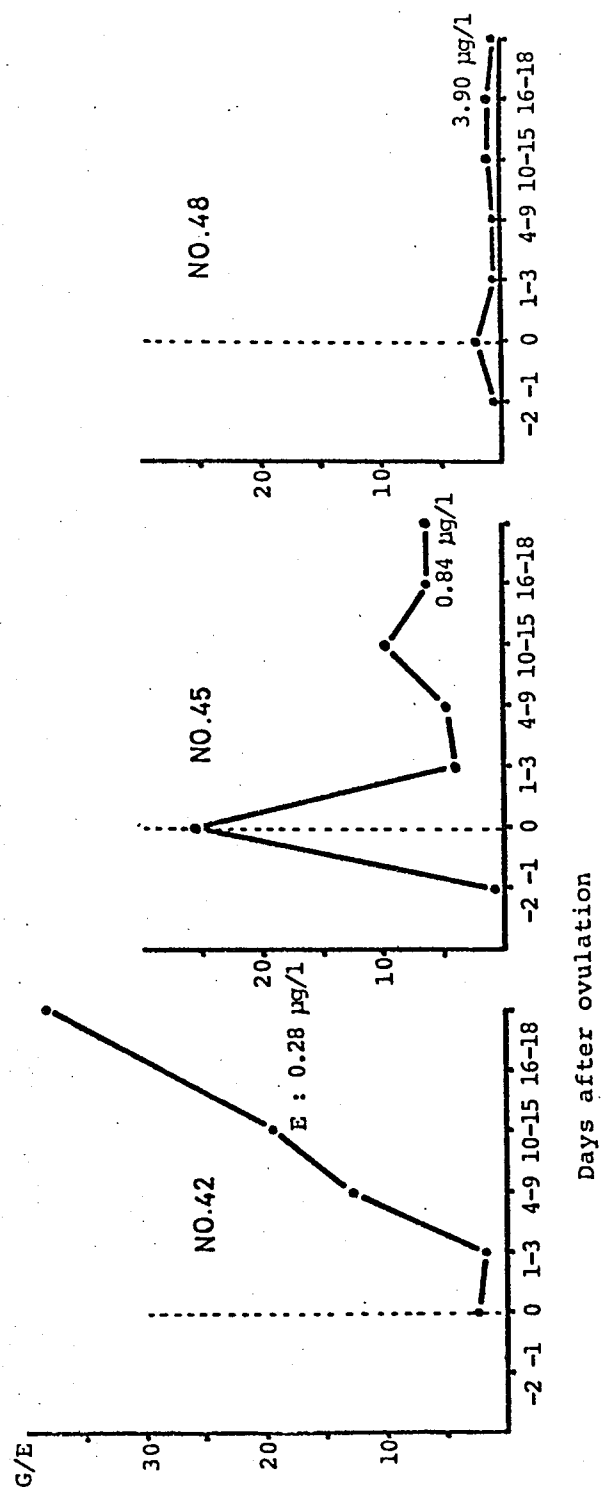
• : Highest estrogen level , ° : Lowest estrogen level
 — : Cow with normal fetus in the uterus
 - - : Cow with dead fetus in the uterus
 — : Infertile cow
 () : Cow No.

Table 6-1. Levels of blood plasma estrogen and gestagen in fertile and infertile cows before and after insemination

Cow No.	Uterine conceptus	Estrus ¹⁾		Luteal stage ²⁾		Estrus ³⁾		Luteal stage ⁴⁾	
		Highest		Lowest		Estrus ³⁾		Luteal stage ⁴⁾	
		Days	Days	Days	Days	Days	Days	Days	Days
42	normal fetus	-3	0	0	Low	Mid	Mid	Mid	Mid
45	normal fetus	-2	0	0	Low	Mid	Mid	Mid	Mid
48	dead fetus	-2	0	0	High	Mid	Mid	Low	Low
34	non	-1	0	0	High	Mid	Mid	Mid	Mid
33	non	0	2	2	High	High	High	High	High
39	non	0	3	3	High	?	?	Mid	Mid
41	non	-2	1	1	High	Mid	Mid	Mid	Mid
35	non	-1	1	1	Mid	High	High	High	High
31	non	0	2	2	Low	Low	Low	Low	Low
32	non	-3	1	1	Low	?	?	Mid	Mid
38	non	0	1	1	Low	Low	Low	Low	Low

1). Days which showed highest or lowest estrogen level (day 0 : day of ovulation)
 2). Low : < 5.0 µg/l , Mid : 5.0 - 10.0 µg/l , High : 10.0 µg/l <
 3). Low : < 2.5 µg/ml , Mid : 2.5 - 5.0 µg/ml , High : 5.0 µg/ml <
 4). Low : < 5.0 µg/ml , Mid : 5.0 - 10.0 µg/ml , High : 10.0 µg/ml <

Fig.6-4. Ratio of gestagen to estrogen in the fertile cow following insemination



第3節 考 按

リポートブリーダーの成り立ちについては種々の要因が複雑に関与していることが推察されるが、Casida¹⁰⁶⁾は受精卵あるいは胚の早期死滅が主因であることを示している。Tanabe & Casida¹⁾、Tanabe & Almquist¹⁰⁷⁾はリポートブリーダーの授精後1カ月以内における胚の死亡率は54.1~65.1%であることを示している。同様にHawk²⁾らは受精後16~34日の間に52%の胚の死滅があることを推定している。

本実験においては授精試験に供したリポートブリーダー9頭のうち、1頭の子宮内には死亡胚が認められたが、残りの8頭の子宮内には胚の発育を示す子宮内容物は存在しなかった。Graden¹⁰⁸⁾はリポートブリーダーにおいて、授精後2~5日に回収した卵のうち38.6%が受精卵であることから、受精障害がかなり高率に発生することを示唆している。生殖器内における精子、卵子の運搬、邂逅、

受精ならびに受精卵の分割を含めた妊娠初期の生殖の管みに比いて、これを阻害する多くの要因が考えられるが、特に性ホルモンの分泌異常が素因となつてゐる場合が多いと推察される。

本実験に比いて胚の発育がみられなかつた8頭の牛の子宮粘膜炎は肉眼的に正常と認められ、また生殖器各部位から病原細菌は検出されなかつた。従つて、これらの牛の不受胎の原因は妊娠のごく初期の過程、すなわち受精あるいは受精卵発育の過程にあつたことが推測される。受胎した1頭における胚はすでに死亡してゐたが、この牛の子宮およびその他生殖器には異常は認められず、さらに細菌検査の結果も陰性であつた。これらの諸点から、これらの牛の受精障害あるいは受精卵なし胚の死亡は、性ホルモンの過不足あるいは不均衡によることが強く疑われた。

本実験における供試牛11頭の排卵前後および授精後の黄体期における血中 estrogen の消

長は、個体によりかなり差違があつた。しかしこの消長型は胎の発育がみられた牛と不受胎牛ではかなり異なつてゐた。すなわち排卵後においては、受胎牛では estrogen 値が排卵前3~2日に最高値を示し、排卵直後には急激に低下して最低値に達した。これに対し、不受胎牛では最高値に達する時期が遅れるものが多い、かつ最低値を示す時期もかなり遅れることが注目された。Shemesh ら^{84,101)} Henricks ら⁸⁰⁾ Mason ら⁵⁵⁾ は正常牛において、発情期の血中 estrogen のピークは発情期初期に形成され、急激に下降することを報告してゐる。このことは本実験の結果とよく一致してゐる。不受胎牛において発情期に estrogen 分泌の遅れ、ならびに高 estrogen 値の持続がみられたことは、これらの内分泌的条件が受精あるいは卵管の機能、ならびに受精卵の発育に対して微妙な悪影響を及ぼすことを示唆するものである。

受精後に比する estrogen の消長は黄体形成に

ともなつてヒークを形成する高 estrogen 群、
 よひ低値のまま経過する低 estrogen 群に大別さ
 れた。2頭の正常妊娠牛は低 estrogen 群に属し
 、死亡胚が存在した1頭は高 estrogen 群に属し
 ていた。胚の早期死滅が高 estrogen 群に発生し
 たことは注目すべきことである。これらの成
 績は妊娠初期における高 estrogen は受精卵の子
 宮粘膜への着床を妨げ、ひいては胚の早期死
 滅をきたす要因になり得ることを示している
 。Henricksら⁸²⁾、Wettman & Hafs¹⁰⁵⁾は妊娠初期の
 血中 estrogen 値はきわめて低値であると述べて
 いる。さらに Randelら¹⁹⁾は授精後9日までの間
 の尿中 estrogen は、不受胎牛よりは受胎牛に比べ
 て高い値を維持することを報告している。
 Underwood & Shier¹⁰⁹⁾は牧草中に含まれる estrogen
 の過剰摂取が、胚の早期死滅の一因になりう
 ることを示唆している。また芦田¹²⁾は黄体初期
 に黄体と卵胞が共存する牛では、頸管粘液結
 晶形成が陽性像を示すものが多い、かつ、こ
 のような卵巣の状態がリヒートブリーダーに

しばしばみられることから、黄体期における estrogen の過剰分泌を不受胎の原因として重視してゐる。

牛卵胞液中の estrogen 含有量について Edgar¹¹⁰⁾, 山内¹¹¹⁾, 小笠原¹¹²⁾, Short^{63,64)}, 百目鬼らの報告⁵²⁾があり、発情期の成熟卵胞液中には高濃度の estrogen とよび progesterone が存在する⁵²⁾ことが認められてゐる。しかし百目鬼らは発情後期、黄体初期および黄体退化期に存在する卵胞では estrogen 含有量がきわめて低い⁵²⁾ことを認めた。したがって黄体初期～黄体退化期に発育する大卵胞が大量の estrogen を分泌し、これが受胎性とさまたげる原因になるとの推論には若干疑問があるが、この点は今後さらに検討を必要とする問題である。

多くの報告^{72, 66, 81, 96, 98, 101, 113, 114)} において progesterone は発情期に最低値を示し、排卵後 4～5日頃から増加しはじめ、17日頃までにピークを形成し、受胎牛ではその後もその値を維持するが、受胎しない牛では、その後急激に減少すること

が示されてゐる。本実験においては、不受胎牛8頭中6頭ならぬに受胎牛3頭において、発情期の estrogen ヒーク形成時期にほぼ一致して、あるいは若干遅れて gestagen の ヒークを形成することを認められた。しかしこの gestagen ヒークの形成、とくにその形状および形成時期と妊否との間には、明瞭な関係を見出すことはできなかった。発情期に出現する gestagen の本態、あるいは生理的意義については今後も追究を必要とする興味ある問題である。

不受胎牛における授精後の gestagen 値は、発情期に明瞭な gestagen の ヒークを形成した6頭では高く、ヒークを形成しなかった2頭では低いことが注目された。黄体期に gestagen が増加した6頭のうち5頭は、発情期における estrogen の低下が受胎牛にくらべてかなり遅れ、排卵後1~3日にみられたものであった。他の1頭の発情期における estrogen の ヒーク形成時期は排卵前日であり、受胎牛にくらべて1~2日遅れていた。このように受胎牛3頭

の撥精後の gestagen 値は、正常に妊娠を維持した2頭の牛では妊娠の進行と共に増加し、高値を維持したが、胚が死亡した1頭では低いことが注目された。このことは、胚が正常に発育するには gestagen のレベル、ならびに estrogen と gestagen の均衡がある範囲に保たれることが必要であることを示唆している。本実験の結果から妊娠を正常に維持し得る両ホルモンの比率 (G/E 比) を示すことは困難であるが、この比率はかなり幅が広いことが推察された。また G/E 比はかなり低くても胚は発育するが、その状態が持続すると胚は死亡する可能性がある。

第4節 小 括

牛における性ホルモンの分泌型と不妊胎との関連を究明する目的で、農家から導入したリポートブリーダー9頭および正常牛2頭に

授精を行ない、10頭は15～28日後に解剖し、1頭は授精後70日まで観察して、胚の発育あるいは死滅と血中遊離性ホルモンの消長との関連を検討した。

1. 胚の発育、死滅の状態 : リポートブリーディング9頭中1頭の子宮内には死亡胚を認めしたが、他の8頭の子宮内には胚あるいはその死滅崩壊を示すものは存在しなかった。正常牛2頭のうち1頭は胎児が正常に発育し、他の1頭は授精後70日まで正常に妊娠を継続した。

2. 血中遊離 estrogen の消長 : 発情期における estrogen 値は受胎牛では排卵前3～2日に最高値を示し、排卵直後には急激に低下して最低値に達した。一方、不受胎牛では最高値に達する時期は1～2日遅れ、羊数は排卵日であった。かつ最低値を示す時期は1例を除き排卵後1～3日でも遅れた。授

精後に於ける estrogen 値は黄体形成にともなつて増加する高 estrogen 群, および低値のまま経過する低 estrogen 群に大別された。正常妊娠牛は後者に属し, 死亡胎が存在した牛のそれは前者に属した。

3. 血中 gestagen の消長 : 発情期に於ける gestagen 値は, 受胎牛ならびに不受胎牛 6 頭について estrogen のピーク形成時期にほぼ一致して, あるいはこれより若干遅れてピークを形成した。授精後の黄体期に於ける gestagen 値は, 不受胎牛では発情期にピークを形成した 6 頭では高く, 他の 2 頭では低かった。受胎牛の gestagen 値は, 正常妊娠牛 2 頭では妊期の進行とともに増加し高値を維持したが, 胎が死亡した 1 頭では低かった。

第7章 総合考察

内分泌学研究所の研究の歴史は一面、ホルモン測定法の開発の歴史であつたとも云われているように、生体内におけるホルモンの作用機転および代謝機構を解明するには、体液中のホルモンを正確に測定することの必要性が強調されてゐる。ところでホルモンは微量で作用を發揮する物質であるために、生体内での濃度がきわめて低く、したがつて従来、その測定は容易ではなかつたが、近年種々の優れた測定法が開発されるに至つた。とくにステロイド分析化学はアイソトープの応用や各種のクロマト技術の発展さらに免疫学的手法の導入等により著しい進歩をとげつつある。すなわち本研究の各章で記述したごとく、ステロイド測定法は生物学的測定法からはじまつて比色測定法、蛍光測定法、ガスクロマトグラフ法、double isotope derivative法などのよりにきわめて高度の技術を必要とするものまで次々と開発

とてきたが、それぞれの測定法には操作、
精度、特異性、感度等種々の点で応用の向
題がなかったわけではなかった。とりわけ生
物学的測定に用いては分画抽出を行なわな
粗抽出物を被検材料として用いてゐるために
、得られた測定値に対しては多少の疑義が持
たれてゐる。しかしながら未知分画を含む統
estrogenの生物学的活性を数量的に表現するこ
の方法は、その感度がきわめて高いこととあ
いまって、分画測定法とは異なる意味で評価
されてゐる。いつの日か本研究で確立した蛍光
測定法は感度、特異性とも優れてゐるユニ
ークな化学的測定法と考へられるが、その操作
が煩雑、かつ高度の技術を必要とするために
広く応用されるには至らなかった。しかしひ
き続いて開発された competitive radioassay法は、
この様相を一変した点で測定法開発の歴史に
大きな転機をひきおこした斬新的な方法と云
ふ。すなわち本法は、きわめて高感度で
、特異的かつ簡便に、大量の検体と処理し得

るといふ優れた長所を有するばかりでなく、
これまでの化学的測定法と異なり、免疫反応
に基づく生物学的方法である点は特に注目に
値するものがある。

本研究においては、性周期ならびに妊娠初
期における牛末梢血中 estrogen, gestagen の動態
を明らかにして、これに基づいてこれらの性
ステロイドの分泌異常と不妊との関連を明
らかにするため、従来からの生物学的測定
法をはじめとして蛍光測定法、さらに competitive
radio-assay 法の中でも特に優れた radioimmu-
no assay 法などの各種のステロイド測定法を
応用した。

1. 性周期における estrogen の動態

牛の性周期における estrogen の動態を生物
学的、あるいは化学的測定法により調べた報
告は数少ない。Mellin & Erb⁶²⁾ は尿についで
、小笠原⁴⁹⁾、山内⁴⁹⁾、松植⁵⁰⁾、菅⁵⁰⁾、岸⁵⁰⁾ によ

岩口⁵¹⁾, Varman⁵⁴⁾ ら, Mason⁵⁵⁾ らは血液に於ける牛の性周期に於ける estrogen の消長と化学的測定法ありいは生物学的測定法により検討してゐる。

小笠⁴⁹⁾ 比よひ山内⁴⁹⁾, 松垣⁴⁹⁾ 比よひ菅⁵⁰⁾, 岸⁵¹⁾ 比よひ黄体開花期に於ける estrogen の活性値は発情期比よひ黄体開花期に於けるエストロゲン形成することを認められてゐる。本研究に於ける生物学的測定法による測定値は個体により量的にかなり差異があつたが、時期的にはほぼ一定の消長を示し、その動態は小笠⁴⁹⁾ ら, 松垣⁵⁰⁾ ら, 岸⁵¹⁾ らの報告にみられるとほぼ一致してゐた。Mellin & Erb⁶²⁾ は化学的方法により性周期に於ける牛尿中の estrogen を測定してゐる。さらに本研究に於いて蛍光測定法により得られた estrogen 測定値も上述の生物学的測定法によるものとほぼ一致して発情期、黄体開花期にエストロゲン形成することが認められた。また性周期の全期間を通じて estradiol の測定値は estrone にくらべてかなり高かつたが、両者はほ

ほぼ同様に増減した。この成績は radioimmunoassay 法あるいは competitive protein binding 法によつて測定した諸家の報告とも^{86, 88, 90)}ほぼ一致するものであった。

radioimmunoassay 法により性周期における牛の末梢血中 estrogen の消長を検討したのは Hicks⁸⁰⁾ら^{81~91)}が最初であり、その後多くの報告がみられる。本研究におけるこの方法による estrogen 測定値は排卵前3~1日に鋭く、高く上昇したが、この点は多くの報告とよく一致している。^{80~91)}しかし、黄体期における estrogen の濃度水準および消長の個体差はかなり大きく、黄体初期から黄体期にかけてピークを形成するものもあれば、明瞭なピークを形成しないものもあった。黄体期における estrogen のピーク形成については数多くの諸家の報告に依りながらも一致してない。これらのことから黄体期における estrogen のピークは、その濃度水準、形成時期、形成数に依りて典型的なものも存在しないものと考えられる

。 Rajakoski¹¹⁹⁾, Hachett ら¹¹³⁾, Echtenkamp & Hansel⁸⁶⁾
 , 百目鬼⁵²⁾ らは牛に於いて黄体期にかなりの大
 きさに発育した卵胞が黄体と共存することを
 認めており、このような黄体期に於ける
 卵胞の発育と estrogen の形成との関連に
 ついては本研究に於いては明確でなかった。
 この点については黄体機能と estrogen 分泌との
 関連を含めて今後検討すべき課題と考えられる。

2. 妊娠初期に於ける estrogen の動態

妊娠初期の血中 estrogen 値は一般にきわめて
 低値で経過するものと云われて^{82,105)}いる。さらに
 不₁₅受胎牛に於ける尿中 estrogen 値が妊娠のこ₁₅く
 初期に於いて受胎牛のそれよりも高いことを
 認め^{19,20)}た報告もみられる。本研究に於いては、
 radioimmunoassay 法により牛血中 estrogen を
 測定した結果、その測定値は正常に妊娠初期
₂₀を経過した牛5頭のうち2頭で排卵後5日目

に一時的に高値を示したが、他は全般に低値であった。これらのことから授精後の日数が少ない妊娠初期に比ける血中 estrogen 値は一般に低く経過するが、高い場合があっても、それが一過性であるならば妊娠が維持されるものと考えられる。

妊娠中に比ける体液中の estriol および est-radiol-17 α について述べた報告が若干見られる。^{90, 92-94, 120)}しかしその消長ならびに生理的意義についてはほとんど明らかにされていない。本研究に比いてはこの面を特に深く追求しなかった。妊娠維持、分娩機序解明などの関連に比いてこの点は今後検討する必要があるものと考えられる。

3. 性周期に比ける gestagen の動態

性周期に比ける末梢血中 gestagen の消長については数多くの報告^{50, 53, 80-82, 85-89, 97-101)}がある。小笠原よび山内⁵³⁾は Hooker-Forbes 法により測定した血中

gestrogen 値は排卵翌日に最低値を示し、黄体の
 發育にもなつて増加し、6~14日の間高値
 と保つた後漸次減少することを認めている。
 さらに発情期にはふたたび増加し、特に排卵
 日には著明に増加し排卵後に減少すること
 を示している。すなわち1性周期の間に gestagen
 は2峰性のピークを形成している。本研究に
 における同じ Hooker-Forbes 法による gestagen 測
 定成績はこれらとほぼ類似していた。しかし
 10、蛍光測定法、radioimmunoassay 法による測定
 成績は1日に1~2回採血による詳細な検討
 結果であるが、発情期における明瞭なピーク
 形成は認められなかった。すなわち蛍光測定
 法、radioimmunoassay 法による成績では、性
 15 周期における血中 progesterone は発情期に最低
 値を示したのち、排卵後3~4日頃から増加
 (はじめ11~16日の黄体間花期に最高値に達
 し、次の排卵前4~6日頃から急激に低下し
 ており、ピークは1峰性であった。この成績
 は紫外部測定法⁶⁶⁾、double isotope derivative 法¹¹⁴⁾

^{72, 81, 121, 122)}
 ガスフロマトグラフ法, competitive protein binding
 法および radioimmunoassay 法による多くの報
^{80-82, 85-89, 97-101)}
 告ときわめてよく一致している。しかし排卵
 前の progesterone の上昇は霊長類, 実験小動物
 をいかにいっては認められて⁷²⁾いる。また Ayalon
¹⁰³⁾
 らは牛に於いて発情開始16時間前に progesterone
 の一時的な増加があることを radioimmunoassay
 法によって明らかにし, この progesterone サ-
 ジが発情発現に対して estrogen とともに相乗
 的な効果をもたらす可能性を示唆している。
¹²³⁾
 さらに山内らは合成 estrogen による鈍性発情
 牛の治療効果はこれに progesterone を併用する
 ことにより高まることを認めている。また
¹²⁴⁾
 Hansel らは牛に於いて発情時に progesterone を
 注射すると排卵が促進されること, さらに排
 卵直前の卵胞の組織学的検索等の結果から,
 卵胞から progesterone が産生され, これが LH
 の放出を惹起して排卵時期を早める可能性を
 示唆している。しかしその後, Kazama & Han-
⁷²⁾
 sel は発情期に6時間ごとに採血した血液に

ついで progesterone を測定し、この時期に progesterone の増加が認められなかったことを報告している。

本研究に於いては radioimmunoassay 法により、1頭の牛について発情開始から54時間後の排卵までの間、2時間を隔て採取した血液について progesterone, 20β -hydroxy-progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone を測定した結果、progesterone は排卵前16~24時間に当る時期にきわめてシヤ-フなピークを形成した。Ayalon¹⁰³⁾ は発情開始前に増加する progesterone の分泌源について、黄体はこの時期には完全に退行して progesterone を産生していないこと、卵巢静脈血中 progesterone がこの時期に最低値を示すこと、さらに卵巢割去牛でも少量の progesterone が血中に存在すること^{84, 125)}、ラットを使用した実験で副腎から分泌される progesterone が発情発現に関与していること¹⁰²⁾ などのことから、卵巢以外、とくに副腎である可能性を示唆している。

本研究に於いて radioimmunoassay 法により

実証された牛における排卵前の progesterone ならぬに 17 α -hydroxy-progesterone の増加は、これが生物学的測定法である Hooker-Forbes 陽性物質値と一致するものであるか否か、またその分泌源が卵巢であるのか副腎であるのか、またその生理的意義が発情発現にかかわるもののであるのか、LH の放出にかかわるもののであるのか、あるいは卵胞に直接作用するものであるのか、これらの点についてはすべて明らかでないが、排卵に gestagen が関与することを示唆する成績としてきわめて興味深い知見である。

なお発情前期から発情期の progesterone の動態については Henricks⁸⁰⁾ らは progesterone は estrogen の増加に先立って低下しはじめなければならないこと、また Snook⁸¹⁾ らは末梢血中 progesterone 濃度が 1 ng/ml 以下になることが LH 放出の条件であることを主張している。本研究においては黄体後期から発情前期にかけて progesterone が急激に低下してほぼ同時に estrogen

の上昇が起り、estrogenが最高値を示した排卵前2日にprogesteroneはほぼ 1 ng/ml 以下に低下し、排卵時にはさらに低下することを認めただが、この成績はこれらの報告とよく一致している。

次に性周期における牛末梢血中の 20β -hydroxy-progesteroneおよび 17α -hydroxy-progesteroneの動態について検討した報告は未だみられない。本研究においては正常性周期を示す牛1頭について、これから性ステロイドの血中の動態を検討した結果、排卵後これから両gestagenはprogesteroneの消長とほぼ一致して増減する傾向がみられた。Gomes⁶⁶⁾らは性周期の各時期における牛黄体組織中のgestagen含有量を測定し、 20β -hydroxy-progesteroneがprogesteroneとほぼ平行して増減することを述べているが、本研究で得られた成績はこの報告とよく一致している。 17α -hydroxy-progesteroneは婦人の月経周期において黄体期と卵胞期の2時期にピークを形成することが認められているが、黄体期

に於けるヒールは黄体機能と反映し、卵胞期に於けるものは卵胞の成熟排卵と関係があると考¹⁰⁴⁾えられてゐる。牛に於ける 17α -hydroxy-progesterone の推移が婦人に於けるそれと同様な役割を果たしてゐるものか否かは興味を持たれり点である。

4. 妊娠初期に於ける gestagen の動態

本研究に於いては正常に姪期と経過した5頭の牛の妊娠初期に於ける末梢血中 progesterone を radioimmunoassay 法によつて検討した結果、末梢血中 progesterone 値は排卵後3~4日から急激に増加しはじめ15~16日以後は観察期間にある妊娠30日前後まで漸増すると思われられた。しかし、本研究に於いて得られた値は性周期に於けるそれと比べて増加速度あるいは濃度水準がやや高い水準を示すことが認められた。このことは従来の報告^{82, 88, 99, 100, 105)}にみられぬべきわめて興味深い所見であるが、こ

の点は同一牛について性周期および妊娠期を通じてなお多く検討する必要があるものと考えられる。妊娠牛における末梢血中の 20β -hydroxy-progesterone と 17α -hydroxy-progesterone の動態を検討した報告はみられない。本研究において妊娠牛1頭について、これから両ステロイドの血中の動態を検討した結果、 20β -hydroxy-progesterone は progesterone とほぼ同様なパターンで増加したが 17α -hydroxy-progesterone は12日をピークに急激に減少し、その後は比較的低下に経過することが認められた。 17α -hydroxy-progesterone の急減が何を意味するものか、その生理的意義は不明であるが興味深い問題である。

5. リポートブリーダーにおける授精前後、妊娠初期の estrogen と $gestagen$ の動態

リポートブリーダーの不妊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

誘因としてホルモンの分泌異常は最も重視されて
 いる。本研究においては生物学的測定法
 によりリポートブリーダーにおける末梢血中
 性ステロイドの動態、とくに胚の早期死滅と
 性ホルモンの不均衡との関連を追求した。

Casida - 派^{1,2,107)} はリポートブリーダーに
 ついて授精後1ヶ月以内に於ける胚の死亡率は50
 %以上あるものと推定している。しかし本研
 究においてはリポートブリーダー9頭のうち
 1頭の子宮内には死亡胚が認められたが、残
 りの8頭の子宮内には胚の発育を示す子宮内
 容物は存在しなかった。またこれらの牛の子
 宮粘膜は肉眼的に正常であり、かつ生殖器各
 部位からは病原細菌は検出されなかった。従
 つて、これらの牛の不受胎の原因は妊娠のこ
 く初期、すなわち受精あるいは受精卵発育の
 過程にあったことが推測される。Gradenら¹⁰⁸⁾ は
 リポートブリーダーにおいて授精後2~5日
 に卵を回収したところ受精卵が38.6% しかな
 かったことから、受精障害がかなり高率に発

生ずることを示唆している。生殖器内にゆける精子、卵子の運搬、邂逅、受精ならぬに受精卵の分割など妊娠初期の生殖の管みについて多くの障害要因が考えられるが、特に性ホルモンの分泌異常が素因となつてゐる場合が多いと推察される。正常牛に比べて、発情期の血中 estrogen のピークは発情開始期に形成され、排卵時には急激に下降することは先に生物学的測定、蛍光測定法あるいは radioimmunoassay 法による成績で実証した。8頭の不受胎牛に比べて発情期に estrogen 分泌の遅れ、ならぬに高 estrogen 値の持続がみられたことは、これらの内分泌的条件が受精あるいは卵管の機能、ならぬに受精卵の発育に対して微妙な影響を与えることを示唆するものと考えられる。

授精試験に供したリポーターブリーダー9頭のうち受胎した1頭に比ける胚は授精後27日目の解剖時すでに死亡してゐたが、この牛の子宮には器質的な異常は認められず、さらに

細菌検査の結果も陰性であった。こゝらの点からこの牛の胚の死亡は性ホルモンの不均衡によることが強く疑われた。すなわちこの牛に於ける血中 estrogen 値は排卵後4日目までは低値で経過したが、7日目頃から増加の傾向を示し、その後解剖時まで高値を継続した。一方血中 gestagen 値は排卵後低値で経過し、10日目過ぎからわずかに増加の傾向が見られたが、解剖時にはふたたび低値を示した。本例の妊娠初期に於ける血中 estrogen ならびに gestagen 値が前述の生物学的測定法ならびに radioimmunoassay 法による正常妊娠牛のそれにくらべて estrogen 値が高く、gestagen 値が低く、かつ不安定な消長を示したことがとくに注目された。またこのことは妊娠初期に於ける高 estrogen ならびに低 gestagen 状態は受精卵の子宮粘膜への着床を妨げ、ひいては胚の早期死滅をきたす要因になるものと考えられる。換言すれば胚が正常に発育するには gestagen のレベル、ならびに estrogen と gesta-

gen の均衡がある範囲に保たれることが必要
であることを示唆している。本研究の結果か
ら妊娠を正常に維持し得る両ホルモンの比率
(G/E比)を示すことは困難である。しかし、
この比率はかなり低くても胚の発育は可能で
あるが、この状態が持続すると胚は死滅する
ことをうかがい知ることが出来た。

第8章 総括ならびに結論

牛血中性ステロイドの測定に生物学的測定法、化学的測定法および放射免疫学的測定法の応用を試み、さらに性ホルモンの分泌異常と不受胎との関連を究明する目的で正常性周期を管む中、妊娠初期の牛およびリポートブリーダーについて末梢血中性ステロイドの動態を比較検討して次の結果を得た。

1. 性ステロイドの測定法について、

1). 牛血中 estrogen の化学的測定法に比色法の高い特異性と蛍光法の高感度とをとり入れた Htrich 蛍光法を応用して、この方法により検出感度 1 ng の微量測定法を確立した。

2). 牛血中 progesterone の化学的測定法に 20 β -hydroxy-steroid dehydrogenase により progesterone

と 20β -hydroxy-progesterone に転換して測定する
 蛍光法を導入し、かつ抽出純化操作に^(薄層クロマトグラフィー)
 応用し、また発色条件を検討して、最少検出
 量 2.5 ng で精度、特異性ともに満足し得る微
 量測定法を確立した。

3). 牛血中 estrogen の測定法に 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た radioimmuno assay
 法を導入し、検出感度 estrone, estradiol-17 β で
 10 pg , estriol で 20 pg , かつ精度、特異性、
 迅速性ともに優れた方法であることを認めた。

4). 牛血中 progesterone, 20β -hydroxy-progesterone
 , 17α -hydroxy-progesterone の測定法に progesterone-
 3-oxime - bovine serum albumin, 20β -hydroxy-progest-
 erone-3-oxime - bovine serum albumin ならびに
 17α -hydroxy-progesterone-3-oxime - bovine serum albu-

min に対する家兎抗血清を使用した radioimmunoassay 法を導入し、本法は検出感度それぞれ 10~20 pg で精度、特異性、迅速性ともに優れた方法でありことを認めた。

2. 性周期における末梢血中性ステロイドの動態について。

1). 正常性周期を示す牛について末梢血中 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、その性周期における消長を比較検討した結果、これらの測定法による測定値はほぼ同様の傾向で増減することを認めた。

2). 性周期における末梢血中 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、たまたま増加する傾向を示したが、その濃度水準はよ

びピーク形成の時期は個体によりかなりの差違があることを認めた。

3). 性周期における末梢血中 gestagen は全般に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が認められた。なお, その濃度水準によるびピーク形成の時期は個体によりかなりの差違があることを認めた。

4). 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. 妊娠初期に比ける末梢血中性ステロイドの動態について.

1). 妊娠初期に比ける末梢血中 estrogen は全般に低値で経過し, 高い場合があつても, きわめて一過性であることを認められた。

2). 妊娠初期に比ける末梢血中 progesterone 値は性周期に比ける黄体期のそれにくらべて増加速度ならびに濃度水準が高い傾向が認められた。

4. リポートブリーダーに比ける末梢血中性ステロイドの動態について.

1). リポートブリーダーに授精を行ない, 授精前後から観察期間中に比ける末梢血中 estrogen とよび gestagen の値を生物学的測定法によつて測定し, この消長を正常妊娠牛に比ける

るそれと比較したところ、不妊胎中の発情期に比ける 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中のそれにくらべて 1~2 日遅延することが注目された。

2). 妊娠初期に比ける estrogen 値は黄体形成にもなって増加する高 estrogen 群および低値のまま経過する低 estrogen 群に大別され、死亡胚が存在した牛は前者に属し、かつ gestagen 値がきわめて低値であることが注目された。

3). 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ほぼ明らかにされた。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始懇切なる御指導をいただいた麻布獣医科大学教授大地隆温博士に心から感謝の意を表します。

本研究は東京大学農学部教授山内亮博士の御鞭達と、農林省家畜衛生試験場飼料安全性研究部長中原達夫博士の御懇篤なる御指導並びに御校閲の賜物である。また本研究の推進に御支援と賜った農林省家畜衛生試験場研究第三部野口一郎部長並びに同部保健衛生研究室長小笠晃博士、御協力と御指導を戴いた同北海道支場乾純夫、橋本和典両博士、帝国臓器製薬株式会社薬理研究部神戸川明、牧野拓雄両博士に対して心から謝意を表します。

最後に本研究の遂行に当って、多大の御協力を戴いた農林省家畜衛生試験場中国支場元場員の諸氏並びに深い御理解を戴いた同研究第三部保健衛生研究室々員諸氏に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Tanabe, T.Y. & L.E. Casida : The nature of reproductive failures in cows of low fertility. J. Dairy Sci. 32, 237, 1949.
- 2) Hawk, H.W., J.N. Wiltbank, H.E. Kidder & L.E. Casida : Embryonic mortality between 16 and 34 days post-breeding in cows of low fertility. J. Dairy Sci. 34, 673, 1955.
- 3) Bartlett, D.E. : Infectious diseases as a cause of infertility. J. Dairy Sci. 32, 36, 1949.
- 4) Hatch, R.D., E.S. Feenstra & L.F. Jennings : A bacteriologic survey of the reproductive tract of infertile cow. J. Am. Vet. Med. Assoc. 114, 131, 1949.
- 5) Eastbrook, H.L. & W.N. Plastridge : Intrauterine antibiotic treatment of vibronic sterility in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 117, 388, 1950.
- 6) Woelffer, E.A. : Some problems of infertility in cattle. Vet. Med. 46, 253, 1951.
- 7) Lindley, D.C. : Intrauterine antibiotic therapy post-service in infertile dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 124, 187, 1954.
- 8) Hawk, H.W., C.A. Kiddy, J.B. Wilson, M. Esposito & A.J. Winter : Bacteriological studies of uteri of clinically normal cows of low fertility. J. Dairy Sci. 41, 120, 1958.
- 9) Simon, J. & S.H. McNutt : Histological alternations of the bovine uterus. II. Uterine tissues from cows of low fertility. Am. J. Vet. Res. 18, 241, 1957.
- 10) Ulberg, L.C., W.G. Black, H.E. Kidder, L.E. McDonald, L.E. Casida & S.H. McNutt : The use of antibiotics in the treatment of low fertility cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 121, 436, 1952.
- 11) 芦田(浄) : 乳牛の交配後における Progesterone 給与による受胎促進. 家畜繁殖誌 4, 73, 1958.
- 12) 芦田(浄) : 乳牛の黄体期における CDS 所見と 19-nor-methyl testosterone の応用. 家畜繁殖誌 7, 80, 1961.

- 13) 高嶺(浩), 吉田(文), 渡辺(壽) : 牛の子宮頸管粘液における結晶形成現象とNaCl及び固形成分含量について. 家畜繁殖誌 4, 119, 1958.
- 14) 高嶺(浩), 吉田(文) : 牛の発情期頸管粘液における精子受容性及び結晶形成現象と粘液組成の関係について. 家畜繁殖誌 6, 143, 1961.
- 15) 高嶺(浩), 渡辺(彰) : 不妊牛におけるヒアルロナーゼ応用時の子宮頸管粘液の精子受容性及びpHについて. 家畜繁殖誌 2, 9, 1956.
- 16) 高嶺(浩), 渡辺(彰) : 牛の子宮頸管粘液における精子受容性及び結晶形成現象と受胎との関連について. 家畜繁殖誌 4, 109, 1958.
- 17) 松垣(繁), 菅(徹) : 牛の性周期に於ける子宮頸管粘液と血中遊離性ホルモンの関係について. 家畜繁殖誌 3, 67, 1957.
- 18) Foote, W.D., R.G.Zimbelman, R.G.Loy & L.E.Casida : Endocrine activity of corpora lutea from first service and repeat breeder dairy heifers. J.Dairy Sci. 42, 1944, 1959.
- 19) Randel, R.D., H.A.Gaverick, R.E.Erb & C.J.Callahan : Reproductive steroids in the bovine. IV. Urinary estrogen excretion rates from 0 to 9 days after breeding in fertile and nonfertile cows. J.Anim.Sci. 32, 1183, 1971.
- 20) Randel, R.D., H.A.Gaverick, A.H.Surve, R.E.Erb & C.J.Callahan : Reproductive steroids in the bovine. V. Comparisons of fertile and nonfertile cows 0 to 42 days after breeding. J.Anim.Sci. 33, 104, 1971.
- 21) Herrick, J.B. : Clinical observation of progesterone therapy in repeat breeding heifers. Vet.Med. 48, 489, 1953.
- 22) Dawson, F.L.M. : Progesterone in functional infertility of cattle. Vet.Record, 66, 324, 1954.
- 23) Johnson, K.R., R.H.Ross & B.L.Fourt : Effect of progesterone administration on reproductive efficiency. J.Anim.Sci. 17, 386, 1958.
- 24) 斎藤(千) : 受胎困難牛に対する黄体ホルモンの応用成績(第1報). 家畜繁殖誌 5, 27, 1959.
- 25) 斎藤(千) : 受胎困難牛に対する黄体ホルモンの応用成績(第2報). 家畜繁殖誌 6, 103, 1961.

- 26) 佐々木(敬) : 低受胎牛に対する黄体ホルモンの応用について.
日獣会誌 13, 492, 1960.
- 27) 三宅(勝), 武山(友), 西本(政), 山口(三), 城(政), 布川(登), 佐々木(英), 澁山(達), 南根(堅), 岡本(敬), 中原(弘), 西之宮(重), 佐々木(敬) : 黄体ホルモンによる低受胎牛治療試験. 家畜繁殖誌 7, 76, 1961.
- 28) Wiltbank, J.N., H.W.Hawk, H.E.Kidder, L.C.Ulberg & L.E.Casida : Effect of progesterone therapy on embryo survival in cows of lowered fertility. J.Dairy Sci. 39, 456, 1956.
- 29) 山内(亮), 中原(達), 橋本(和), 小笠(晃), 志賀(鑑), 片岡(敏), 乾(純), 内山(八) : 低受胎牛に対するニ・ミの処置について. 家畜繁殖誌 7, 53, 1961.
- 30) Allen, W.M. & E.A.Doisy : An ovarian hormone. J.Am.Med. Assoc. 81, 819, 1923.
- 31) Corner, G.W. & W.M.Allen : Physiology of the corpus luteum. Am.J.Physiol. 88, 326, 1929.
- 32) Szego, C.M. & S.Roberts : The determination of protein bound blood estrogen. Endocrinology 41, 322, 1947.
- 33) Sulman, F.G. : Intravaginal assay of estrogens. Endocrinology 50, 61, 1952.
- 34) Biggers, J.D., P.J.Claringbold & C.W.Emmens : A study of the variation in response of ovariectomized mice to the intravaginal and subcutaneous administration of oestrogens. J.Endocrinol. 11, 26, 1954.
- 35) 小林(隆), 中山(徹) : Estrogenの生物学的微量定量法.
日産婦誌 4, 656, 1954.
- 36) 藤井(久), 藤山(融), 星野(一) : 去勢マウスの腔内注入による Estrogenの生物学的微量検定1変化. 臨床婦人科産科 9, 643, 1955.
- 37) Biggers, J.D. & P.J.Claringbold : Mitotic activity in the vaginal epithelium of the mouse following local oestrogenic stimulation. J.Anat. 89, 124, 1955.
- 38) McPhail, M.K. : The assay of progestin. J.Physiol. 83, 145, 1934.
- 39) Hooker, C.W. & T.R.Forbes : A bio-assay for minute amount of progesterone. Endocrinology 41, 158, 1947.

- 40) Pincus, G., T. Miyake, A. P. Merrill & P. Longo : The bioassay of progesterone. *Endocrinology* 61, 528, 1957.
- 41) Brown, J. B. : A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine. *Biochem. J.* 60, 185, 1955.
- 42) Ittrich, G. : Eine neue metode zue chemischen bestimmung des estrogenen hormone in harn. *Z. Physiol. Chem.* 312, 1, 1958.
- 43) Preedy, R. K. & E. H. Aitken : The determination of estrone, estradiol-17 β , and estriol in urine and plasma with column partition chromatography. *J. Biol. Chem.* 236, 1300, 1961.
- 44) Roy, E. J. : Application of the Ittrich extraction procedure to the fluorimetric measurement of oestrogens in blood. *J. Endocrinol.* 25, 361, 1962.
- 45) Heap, R. B. : A fluorescence assay of progesterone. *J. Endocrinol.* 30, 293, 1964.
- 46) Murphy, B. E. P., W. Engelberg and C. J. Patte : Simple method for the determination of plasma corticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 23, 293, 1963.
- 47) Abraham, G. E. : Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 866, 1969.
- 48) Forbes, T. R. : Pre-ovulatory progesterone in the peripheral blood of rabbit. *Endocrinology* 53, 79, 1953.
- 49) 小笠(晃), 山内(亮) : 牛の正常性周期における血中遊離雌性ホルモンの消長について. 第1報. 血中遊離 estrogen の測定. *家畜繁殖誌* 2, 121, 1957.
- 50) 松垣(繁), 菅(徹) : 乳牛の性周期における血中性ホルモンの消長について. *家畜繁殖誌* 3, 65, 1957.
- 51) 岸(晃), 谷口(隆) : マメ科植生率の高い草地に放牧した乳牛の性周期における血中遊離 Estrogen の消長. *家畜繁殖誌* 11, 112, 1966.
- 52) 百目鬼(郁), 中原(達), 金田(義), 山内(亮) : 牛卵胞液の estrogen 及び gestagen 含有量について. *家畜繁殖誌* 18, 94, 1972.

- 53) 小笠(晃).山内(亮).内山(八) : 牛の正常性周期における血中遊離性ホルモンの消長について,(第2報). 血中遊離Progesteroneの測定. 畜産繁殖誌 3, 123, 1958.
- 54) Varman, P.N., E.P. Smith & M.W. Hull : Estrogen secretion and excretion during estrus in dairy cows. J. Dairy Sci. 47, 687, 1964.
- 55) Mason, B.D., C.R. Krishnamurti & W.D. Kitts : Oestrone and oestradiol in jugular vein plasma during the oestrous cycle of the cow. J. Endocrinol. 55, 141, 1972.
- 56) Short, R.V. : Progesterone in blood. I. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. J. Endocrinol. 16, 415, 1958.
- 57) Zander, J. & H. Simmer : Die chemische Bestimmung von Progesterone in organischen Substraten. Klin. Wschr. 32, 529, 1954.
- 58) Roy, E.J. & J.B. Brown : A method for the estimation of oestriol, oestrone and oestradiol-17 β in the blood of the pregnant woman and of the foetus. J. Endocrinol. 21, 9, 1960.
- 59) Allen, W.M. : A simple method for analysing complicated absorption curves, of use in the colorimetric determination of urinary steroids. J. Clin. Endocrinol. 10, 71, 1950.
- 60) van der Molen, H.J. & D. Groen : Determination of progesterone in human peripheral blood using gas-liquid chromatography with electron capture detection. J. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 1625, 1965.
- 61) Scholler, R., P. Leymarie, M. Heron & M.F. Jayle : A study of oestrogen fluorescence using Ittrich's procedure. Acta Endocrinol. 52, Suppl (107), 7, 1966.
- 62) Mellin, T.N. & R.E. Erb : Estrogen metabolism and excretion during the bovine estrous cycle. Steroids 7, 589, 1966.
- 63) Short, R.V. : Steroids present in the follicular fluid of the cow. J. Endocrinol. 23, 401, 1962.
- 64) Short, R.V. : Steroid concentrations in normal follicular fluid and ovarian cyst fluid from cows. J. Reprod. Fertil. 4, 27, 1962.
- 65) Touchstone, J.C. & T. Murwec : Enhancement of the fluorescence of progesterone (and other steroids) in sulfuric acid. Analyt. Chemist. 32, 822, 1960.

- 66) Gomes, W.R., V.L. Estergreen, O.L. Frost & R.E. Erb : Progesterin levels in juglar and ovarian venous blood, corpora lutea, and ovaries of the nonpregnant bovine. J.Dairy Sci. 46, 553, 1963.
- 67) Eeb, R.E. & F. Stormshak : Progesterins in corpora lutea, ovaries and adrenals after estrus and breeding of normal and abnormal cows. J.Dairy Sci. 44, 888, 1961.
- 68) Mares, S.E., R.G. Zimbelman & L.E. Casida : Variation in progesterone content of the bovine corpus luteum of the estrual cycle. J.Anim.Sci. 21, 266, 1962.
- 69) Staples, R.E. & W. Hansel : Luteal function and embryo survival in the bovine. J.Dairy Sci. 44, 2040, 1961.
- 70) Cupps, P.T., R.C. Laben & S.W. Mead : Histology of pituitary, adrenal and reproductive organs in normal cattle and cattle with lowered reproductive efficiency. Hilgardia 29, 383, 1959.
- 71) Dobrowolski, W., E. Stupnicka & E. Domanski : Progesterone levels in ovarian venous blood during the oestrous cycle of the cow. J.Reprod.Fertil. 15, 409, 1968.
- 72) Kazama, N. & W. Hansel : Preovulatory changes in the progesterone level of bovine peripheral blood plasma. Endocrinology 86, 1252, 1970.
- 73) 牧野(拓) : 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay. 日内合誌 49, 629, 1973.
- 74) 山本(慧), 大沢(伸) : エルモットの血清を用いる progesterone の competitive protein binding assay について. 日内合誌 46, 105, 1971.
- 75) 鳥居(隆), 中間(宗), 藺守(竜) : 妊娠エルモット血漿を用いた CPBA 法によるウシの血中 Progesterone 測定法(予報). 日獣学誌 33, 270, 1971.
- 76) Domeki, I., T. Nakahara, M. Yamauchi & A. Kanbegawa : Fluorometric determination of blood plasma progesterone during estrous cycle in the cow. Nat.Inst.Anim.Hlth. Quart. 12, 102, 1972.
- 77) 神戸川(明), 牧野(拓), 中野渡(亀) : Radioimmunoassay による 20α -OH-P, 20β -OH-P, 17α -OH-P および Progesterone の測定法とエルの周期による血中濃度について. 第79回日獣学会講演要旨 155, 1975.

- 78) 吉田(孝). 稲富(題). 尾崎(晴). 高木(繁). 牧野(拓). 神戶川(明) :
性ステロイドホルモンの radioimmunoassay (その7). -17 α -hydroxy-
progesterone の radioimmunoassay.
ホルモンと臨床 22, 773, 1974.
- 79) Wu, C.H. & L.E. Lundy : Radioimmunoassay of plasma estrogens. Steroids 18, 91, 1971.
- 80) Henricks, D.M., J.F. Dickey & J.R. Hill : Plasma estrogen and progesterone levels in cows prior to and during estrus. Endocrinology 89, 1350, 1971.
- 81) Snook, R.B., R.R. Saatman & W. Hansel : Serum progesterone and luteinizing hormone levels during the bovine estrous cycle. Endocrinology 88, 678, 1971.
- 82) Henricks, D.M., J.F. Dickey, J.R. Hill & W.E. Johnston : Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows. Endocrinology 90, 1336, 1972.
- 83) Hoffman, B. : Determination of oestrogens in bovine peripheral plasma by radioimmunoassay. J. Endocrinol. 52, XVI, 1972.
- 84) Shemesh, M., N. Ayalon & H.R. Lindner : Oestradiol levels in the peripheral blood of cows during the oestrous cycle.
- 85) Wettman, R.P., H.D. Hafs, L.A. Edgerton & L.V. Swanson : Oestradiol and progesterone in blood serum during the bovine oestrous cycle. J. Anim. Sci. 34, 1020, 1972.
- 86) Echterkamp, S.E. & W. Hansel : Concurrent changes in bovine plasma hormone levels prior to and during the first postpartum estrous cycle. J. Anim. Sci. 37, 1362, 1973.
- 87) Henricks, D.M., J.R. Hill & J.F. Dickey : Plasma ovarian hormone levels and fertility in beef heifers treated with melengestrol acetate (MGA). J. Anim. Sci. 37, 1169, 1973.
- 88) Glencross, R.G., I.B. Munro, B.E. Senior & G.S. Pope : Concentrations of oestradiol-17 β , oestrone and progesterone in jugular venous plasma of cows during the oestrous cycle and in early pregnancy. Acta Endocrinol. 73, 374, 1973.
- 89) Christensen, D.S., M.L. Hopwood & J.N. Wiltbank : Levels of hormones in serum of cycling beef cows. J. Anim. Sci. 38, 577, 1974.

- 90) Dobson, H. & P.D.G. Dean : Radioimmunoassay of oestrone, oestradiol-17 α and 17 β in bovine plasma during the oestrous cycle and last stages of pregnancy. J. Endocrinol. 61, 479, 1974.
- 91) Drinan, J.P. & R.I. Cox : Oestrogens in bovine peripheral plasma. J. Reprod. Fertil. 36, 489, 1974.
- 92) Robertson, H.A., T.C. Smeaton & R. Durnford : A method for the extraction, separation and estimation of unconjugated estrone, estradiol-17 α and estradiol-17 β in plasma. Steroids 20, 651, 1972.
- 93) Robertson, H.A. : Changes in the concentration of unconjugated estrone, estradiol-17 α and estradiol-17 β in the maternal plasma of the pregnant cow in relation to the initiation of parturition and lactation. J. Reprod. Fertil. 36, 1, 1974.
- 94) Lunaas, T., A.O. Refsdal & O. Garm : Urinary excretion of oestrone and oestradiol-17 α in cows with cystic ovaries. Acta Endocrinol. 75, 350, 1974.
- 95) 牧野(拓), 神戸川(明), 吉田(孝), 田(根), 向井(久), 山地(瑞), 尾崎(晴), 高木(繁) : Radioimmunoassayによる血中Progesteroneの簡易測定法. 臨床病理 21, 930, 1973.
- 96) 百目鬼(郁), 中原(達), 山内(亮) : 性周期における牛末梢血中progesteroneの蛍光測定
家畜繁殖誌 20, 71, 1974.
- 97) Rao, C.V. & V.L. Estergreen : Determination of bovine plasma progesterone. J. Dairy Sci. 52, 904, 1969.
- 98) Donaldson, L.E., J.M. Bassett & G.D. Thorburn : Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycle, pregnancy and lactation and the effects of under nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. J. Endocrinol. 48, 599, 1970.
- 99) Henricks, D.M., J.F. Dickey & G.D. Niswender : Serum LH and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. Biol. of Reprod. 2, 346, 1970.
- 100) Henricks, D.M., D.R. Lamond, J.R. Hill & J.F. Dickey : Plasma progesterone concentration before mating and in early pregnancy in the beef heifers. J. Anim. Sci. 33, 450, 1971.
- 101) Shemesh, M., H.R. Linder & N. Ayalon : Competitive protein binding assay of progesterone in bovine jugular venous plasma during the oestrous cycle. J. Reprod. Fertil. 26, 167, 1971.

- 102) Feder, H.H., K. Brown-Grant & C.S. Corker : Pre-ovulatory progesterone, the adrenal cortex and the critical period for LH release in rats.
- 103) Ayalon, N. & M. Shemesh : Pro-oestrous surge in plasma progesterone in the cow. *J.Reprod.Fertil.* 36, 239, 1974.
- 104) Strott, C.A., T. Yoshimi, G.T. Ross & M.B. Lipsett : Ovarian physiology : Relationship between plasma LH and steroidogenesis by the follicle and corpus luteum ; Effect of HCG. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 29, 1157, 1969.
- 105) Wettmann, R.P. & H.D. Hafs : LH, prolactin, estradiol and progesterone in bovine blood serum during early pregnancy. *J.Anim.Sci.* 36, 51, 1973.
- 106) Casida, L.E. : Present status of the repeat-breeder cow problem. *J.Dairy Sci.* 44, 2323, 1961.
- 107) Tanabe, T.Y. & J.O. Almquist : Some causes of infertility in dairy heifers. *J.Dairy Sci.* 36, 586, 1953.
- 108) Graden, A.P., Durward Olds, C.R. Mochow & L.R. Mutter : Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. *J.Dairy Sci.* 51, 778, 1968.
- 109) Underwood, E.J. & F.L. Shier : The incidence of oestrus ewes grazing on subterranean-clover pastures. *Austral Vet.J.* 28, 157, 1952.
- 110) Edgar, D.G. : The progesterone content of body fluids and tissues. *J.Endocrinol.* 10, 54, 1953.
- 111) 山内(亮) : 牛の卵巣嚢腫に関する研究. IV. ホルモン治療における治療機転について. *日獣学誌* 17, 47, 1955.
- 112) 小笠(晃), 中原(肇), 山内(亮) : 卵胞のう腫内溶液中の性ホルモンについて. *家畜繁殖誌* 7, 25, 1962.
- 113) Hackett, A.J. & H.D. Hafs : Pituitary and hypothalamic endocrine changes during the bovine estrous cycle. *J.Anim.Sci.* 28, 531, 1969.
- 114) Plotka, E.D., R.E. Erb, C.J. Calahan & W.R. Gomes : Level of progesterone in peripheral blood plasma during the estrous cycle of the bovine. *J.Dairy Sci.* 50, 1158, 1967.

- 115) Abraham, G.E., R.Swerdloff, D.Tulchinsky & W.D.Odell :
Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 32,619,1971.
- 116) Furuyama, S. & C.A.Nugent : A radioimmunoassay for
plasma progesterone. *Steroids* 17,663,1971.
- 117) Spieler, J.M., R.L.Webb, R.J.Saldarini & J.A.Coppola :
A radioimmunoassay for progesterone. *Steroids.* 19,751,
1972.
- 118) De Villa, G.O., K.Roberts, W.G.Wiest, G.Mikhail &
G.Flickinger : A specific radioimmunoassay of plasma
progesterone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 35,458,1972.
- 119) Rajakoski, E. : The ovarian follicular system in sex-
ually mature heifers with special reference to seasonal,
cyclical and left-right variation. *Acta Endocrinol.* 52,
(Supple), 1,1960.
- 120) Erb, R.E., R.D.Randel, T.N.Mellin & V.L.Estergreen :
Urinary estrogen excretion rate during pregnancy in the
bovine.
- 121) Pope, G.S., S.K.Gupta & I.B.Munro : Progesterone levels
in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovari-
ectomized cows. *J.Reprod.Fertil.* 20,369,1969.
- 122) Stabenfeldt, G.H., L.L.Ewing & L.E.McDonald : Peripheral
plasma progesterone levels during the bovine oestrous
cycle. *J.Reprod.Fertil.* 19,433,1969.
- 123) 山内(亮), 中原(達), 橋本(和), 乾(純), 内山(八), 麻山(力) :
Estrogen-Progesterone 併用による牛の鈍性発情の治療について.
家畜繁殖誌 4, 167, 1959.
- 124) Hansel, W. & G.M.Trimberger : The effect of progesterone
on ovulation time in dairy heifers. *J.Dairy Sci.* 35,
65,1952.
- 125) McCracken, J.A. : Plasma progesterone concentration
after removal of the corpora lutea in the cow. *Nature*
198,507,1963.