

氏名 (本籍)	百目鬼 郁 男 (茨城)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙 第 113 号
学位授与の日付	昭和52年9月20日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 教授 大地 隆 温 (副査) 教授 杉 浦 邦 紀 教授 藤 岡 富士夫

論文内容の要旨

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

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

本研究では牛における受精障害，あるいは胚の早期死滅と性ホルモンの分泌異常との関連性を究明する目的で，先ず牛の血中 estrogen および gestagen を測定するための化学的測定法ならびに radioimmunoassay 法について測定条件を吟味して，手法を確立し，これらの方法ならびに従来の生物学的測定法を併せて用いて，正常性周期および妊娠初期における牛末梢血中 estrogen および gestagen の動態を明らかにした。ついでリビートブリーダー牛を実験的に授精後15～28日の間に屠殺解剖して，子宮における胚の存在，あるいはその発育状態ならびに生殖器の器質的異常，細菌感染などについて検索するとともに授精前から屠殺時までの末梢血中 estrogen および gestagen の動態を追求して，不受胎牛ならびに受胎牛の間にはこれら性ステロイドの分泌型に顕著な相違があることを明らかにした。

以下に得られた成績の概要を記す。

1. 性ステロイドの測定法

1) 化学的測定法

牛血中 estrogen の測定に，比色法の高い特異性と蛍光法の高い感度を取り入れた Ittrich 蛍光法を応用するために，その測定条件を吟味して，Xenon ランプを使用した日立分光蛍光光度計 MPF-2A および 203 型による Ittrich color の最大波長は estrone, estradiol および estriol とともに共通で，励起光 538 nm,

螢光 552.5 nm であることを明らかにし、さらに実際の測定においては両波長の接近を避けるために 510~520 nm で励起して、螢光を 552.5 nm 前後で読む方法を検討して検出感度 1 ng の微量測定法を確立した。

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

2) radioimmunoassay 法

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

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

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

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

2. 性周期における末梢血中性ステロイドの動態

正常性周期を示す牛 21 頭を用い、頭静脈から経日的に採取した血液材料について estrogen および gestagen の濃度を生物学的測定法、化学的測定法および radioimmunoassay 法で測定して、性周期におけるこれら性ステロイドの消長を比較検討した結果、生物学的測定法による測定値は他のふたつの測定法によるそれに比べて高い値を示すが、いずれの方法によっても性周期の各時期における末梢血中の estrogen および gestagen あるいは progesterone の測定値はほぼ同様の傾向で増減することを認めた。

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

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

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

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

3. 妊娠初期における末梢血中性ステロイドの動態

正常妊娠牛5頭について発情前期から授精後31~32日までの間に頸静脈から採取した血液材料について、妊娠初期における estrogen および gestagen の濃度を radioimmunoassay 法により測定した結果、estrogen は全般に低値 (2.3~6.0 pg/ml) で経過し、やや高い場合があっても、その期間はきわめて短く一過性であること、また progesterone のピーク値は $6.0 \pm 1.7 \text{ ng}/\text{ml}$ で性周期における黄体期のそれに比べて増加速度が早く、かつ濃度水準が高い傾向があることを認めた。さらに 20 β -hydroxy-progesterone は progesterone とほぼ同様に消長するが、17 α -hydroxy-progesterone は排卵後12日までは progesterone とほぼ同様に消長し、その後は急減して比較的低値で経過することを認めた。

4. リ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

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

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

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

論文審査の結果の要旨

雌牛の繁殖障害には種々の原因によるものがあり、その発現機序がほぼ判明しているもの、ある程度の推測はなされているが確かな実験的裏付けを伴わないものなど、まちまちである。

野外における雌牛の繁殖障害中、厄介視されているものに、いわゆるリポート・ブリーダーがある。これは一見正常様の所見を呈するにもかかわらず数回授精を繰り返しても受胎しないものであるが、その主なる

原因は受精卵の子宮粘膜への着床障害によるのではないかと推察されているが、総合的な実験により着実にこのことを証明した報告はみあたらない。

周知のとおり、繁殖機能は直接的には性ホルモンの質的、量的バランスにより統御されており、とくに卵着床現象に重大な役割をもつ性ステロイドホルモンである estrogen と progesterone の動態を知ることが繁殖分野においては今後益々必要欠くべからざるものと考えられる。

本論文はこれらの観点から正常牛ならびにリピート・ブリーダーを対象とし、その性周期中及び妊娠初期(授精後当分の間)の末梢血中 estrogen 及び progesterone を測定し、正常牛とリピート・ブリーダーを比較し、さらに授精後、適当な時期に解剖して受精卵(胚)の状況を調べ、その結果と両ステロイドホルモンとの関係を考察し、正常なホルモン動態と併せてリピート・ブリーダーの原因を探究せんと試みたものである。

しかしながら、牛は他種動物に比較して血中性ステロイドホルモン量が極めて少なく、その測定には人間等に應用されている常法にくらべ、かなりの工夫、改善が必要であり、著者はこの点について、生物学的測定、比色蛍光による化学的測定、近年開発されたラジオイムノアッセイ等につき、過去10数年にわたって検討し、適切な手法を確立し、これを駆使して雌牛のホルモン測定を行なったものである。

したがって、この論文の主旨である性周期ならびに妊娠初期の血中性ステロイドの動態、これによるリピート・ブリーダーの原因究明等に関する成果はもちろんであるが、同時に家畜とくに牛の性ステロイドホルモン測定技術面への貢献度も高く評価されるものである。

以下実験の内容を簡単に示すと

1. 性ステロイドホルモンの測定

(1) 化学的測定法

末梢血中 estrogen 測定については従来の比色蛍光法における測定条件を吟味した結果、励起光 538 nm、蛍光 552.5 nm であることを明らかにし、更に実際の測定時には両波長の接近をさけるため 510~520 nm で励起して、蛍光を 552.5 nm 前後で読む方法が優れていることを確認している。

progesterone については、これを 20 β -hydroxysteroid-dehydrogenase により 20 β -hydroxy-progesterone に転換する方法が用いられているが、この Heap の蛍光法における抽出純化時、薄層クロマトグラフィーを導入したこと、展開剤及び発色操作を改善し血中 progesterone の最少検出量を 2.5 ng 確立し満足すべき結果を得ている。

(2) ラジオイムノアッセイ法

高力価抗血清の使用が要諦であるが、estrogens についての抗原として、estrone-6-oxime-bovine serum albumin, estradiol-17 β -6-oxime-bovine serum albumin ならびに estriol-6-oxime-bovine serum albumin を用い、それに対する抗血清により牛血中 estrogens についての各分画、すなわち、estrone, estradiol, estriol の存在の確認及びその測定が可能であり、検出感度が estrone, estradiol はともに 10 pg, estriol では 20 pg という高感度測定法を確立したこと。

また牛血中 gestagen すなわち progesterone, 20 β -hydroxy-progesterone, 17 α -hydroxy-progesterone の測定に関し、それぞれのホルモんに -3-oxime-bovine serum albumin 結合の抗原を使用した家兎抗血清により、各ホルモン 1.0~2.0 pg を検出できる手法を確立したこと。

また、progesterone 抽出過程においてクロマト操作を省いても結果には影響のないことを確かめ簡易法をも考案し、実用的な術式を樹立したこと等があげられる。

つぎにこれらの手法を用いて牛の性周期中の各ステージにおける末梢血中ステロイドの測定を行なっている。

2. 性周期における末梢血中ステロイドの動態

正常性周期を示す牛21頭につき、生物学的、化学的及びラジオイムノアッセイ法で経時的にホルモンの消長を検討しているが、いずれの方法によっても、estrogen および gestagen あるいは progesterone は各検査法にかかわらず同様のパターンで増減している。すなわち、estrogen は発情期、排卵前に高くなり、排卵後低下した後、黄体期には再び増加し次第に減少している。

gestagen は黄体期に最高、発情期は低値であった。しかし個体により、その濃度及びピーク形成時期には多少個体差も認められている。

なお、排卵前後のホルモンの詳細な消長を知るために、正常牛1頭を2時間間隔で採血し検査したところ、progesterone ならびに 17α -hydroxy-progesterone が排卵前に一過性に上昇する成績を得ており、今後排卵の機序を考察するうえでの一つの示唆ともいえるようである。

3. 妊娠初期における末梢血中性ステロイドの動態

妊娠初期（授精後当分の間）における estrogen, progesterone の作用は極めて微妙な役割を演ずるものと考えられているが、著者は発情前期から授精後約30日まで経時的に採血し、estrogen, progesterone を測定し、estrogen は全般に低値（ $2.3\sim 6.0\text{ pg/ml}$ ）で、やや高い場合があっても一過性で短かく、progesterone は $6.0\pm 1.7\text{ ng/ml}$ で発情周期中の黄体期に比べ増加速度が早く、濃度水準も高いことを認めている。

以上のべた正常と思われるもののホルモン消長を基準にして、リピート・ブリーダーとの比較を行なっている。

4. リピート・ブリーダーにおける末梢血中ステロイドの動態

あきらかにリピート・ブリーダーと診断された9頭に授精し、授精前から経時的にホルモン量を測定しているが、リピート・ブリーダーでは estrogen の最高値に達する時期及び低値になる時期が正常牛の発情前後のパターンに比べ1～2日遅延する結果を得ている。また、gestagen 値の上昇が認められず、反対に estrogen が高値のものが多く、これらの多くは胚の死亡を伴ったことを解剖して確認しており、両ホルモンの関係を強調している。すなわち、卵着床時期における estrogen 優位による着床障害が不妊の原因であるとの結論を得ている。

以上、本論文は従来困難視されていた牛血中性ステロイドホルモン測定法を改善したこと、その手法を用いて牛における estrogen, progesterone の基本的なパターンを確定したこと、さらにこれらをもとにして原因がはっきり把握できず、治療の結果から原因を推察する程度にとどまっていた、リピート・ブリーダーについて、ホルモン支配と卵着床との関係を、この種の実験の困難な牛について、はっきり実験的に結論づけ、予防や治療に対する根拠を与えたこと等、牛の繁殖面に対して裨益するところは大きく、高く評価されるものであり、獣医学博士を授与するにふさわしい業績と認められる。