

氏名(本籍)	紫 野 正 雄 (東京都)
学位の種類	博士 (獣医学)
学位記番号	乙第382号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	発情豚の子宮頸管部粘液への好中球遊走現象に関する研究
論文審査委員	(主査) 小 林 好 作 (副査) 館 郷 川 上 静 夫 大 地 隆 温

論文内容の要旨

繁殖年齢に達した雌豚は、21日周期で2から3日間の発情を年間を通して繰り返す、いわゆる多発情動物である。発情時には、動物種ごとに異なる徴候が示される。発情時における豚の特徴的な変化の一つは頸管粘液中に多数の好中球が出現することである。この現象は臨床的には古くから知られていたが、その生物学的意義ならびに機序はほとんど解明されていない。一般に、局所組織への好中球の遊走は炎症時の特徴とされている。同じような現象が繁殖における一過程の生理的現象である発情期に、しかも豚の頸管粘液中に限ってみられるのは極めて興味深い。この現象の内分泌学的機序を解明する目的で一連の実験を行った。

1. 豚の繁殖周期に伴い頸管粘液中好中球（以下好中球と略す）数は変化する。そこで発情期、妊娠期、分娩期、授乳期に出現する好中球数を調べた。経産豚2頭を用い、発情前4日から交配、妊娠、分娩、授乳における150日間毎日、頸管部第2皺壁部から演者考案の綿棒方式で粘液を採取し、粘液中の好中球数を測定した。好中球数は発情前2日目から発情当日にかけて大きな1峰性ピークで増加した。その後、妊娠が進行するとその数は減少する。分娩5日前からその数は次第に増加傾向を示し、分娩後3から5日にかけて発情期と同等かその約4倍以上となり、1峰性の特異なピークを形成した。

結果、好中球数は、発情期の前後と分娩後5日目以内に特異的に増加することを確認した。これらのことは特に内分泌学的な変化と密接に関連している可能性が示唆された。

2. 発情期前後を中心に好中球数の変化と内分泌学的関係を検討した。経産豚4頭を用い、発情期を中心に好中球数と外部徴候の変化を2回繰り返し調べた。外部徴候の検査項目は雄許容反応と充血、腫脹とした。供試豚4頭は、2回の発情周期で測定した結果、好中球数は発情開始前1日から発情開始後1日の間に1峰性ピークで増加した。雄許容反応は好中球数が増加し始める前後から出現し、約3日間前後持続した。

他の経産豚3頭を、好中球数の変化、血中 E_2 、P濃度と排卵時間帯との関連性を確認するために用いた。血中 E_2 、P濃度の測定はRIA法、排卵時間帯の確認は試験的開腹手術法と受精卵の分割所要時間によった。

3頭には発情開始後36時間以内に2回の交配を行なった。その後、開腹手術によって卵管から受精卵を回収した。3頭中1頭では、交配後28時間目に3～4細胞期胚が確認された。他の1頭では、交配後15時間と25時間目で卵子を確認できなかった。しかし30時間後のと殺によって2細胞期胚が認められた。残り

の1頭では、交配後38時間後に未受精卵を確認した。ブタの受精卵が2細胞期胚になるまでには14~19時間、4細胞期胚になるには24時間必要とされている。これらを根拠に排卵時間帯を推定すると、発情開始後26~38時間となった。

血中 E_2 濃度は、発情開始前3日目から上昇をはじめ、発情開始前日から推定排卵日に向けて低下した。一方、P濃度は、発情開始前日から推定排卵日に向けてゆるやかに上昇し始めた。好中球数のピークは、血中 E_2 濃度のピークから遅れること2日~3日目に認められた。丁度、血中 E_2 濃度が低下し、P濃度がやや上昇し始める時期にあたっていた。また、好中球数のピークと排卵時間帯との関連は、推定排卵開始1日前から排卵時間帯と丁度重なることが確認できた。外部徴候は、血中 E_2 、P濃度と密接に関連して変化していることが認められた。

以上の結果から、好中球数の増加は発情期の短時間内に限定されていて、排卵前または排卵時間の早期に認められ、血中エストロゲン濃度の変化と密接に関連していることが確認できた。

3. 発情期における好中球数の増加は、血中エストロゲンが主体となって起こる変化と推定された。そのことを確認するため、卵巢摘出豚を用いて、エストロゲンおよびプロゲステロンを単独および併用投与し疑似発情を誘起した。この実験を通して好中球数の増加が正常な発情と同じように再現されることを期待した。

卵巢摘出豚7頭を用いた。投与したのは estrone(E_1)、estradiol-17 β (E_2)、estriol(E_3)と progesterone(P)である。これら試験のうちから、副生殖器に対して最も生理的反応の強いとされている E_2 を投与した成績を報告する。 E_2 (投与量0.2、0.5および1.0mg)は、1回投与し、好中球数の特異的な変化が起こるかどうかが観察した。また、この試験を通して自然発情と同等の再現がどの E_2 投与量でみられるかも観察した。さらに E_2 投与量をほぼ一定にしてP量(投与総量300、500、700mg)を投与したとき、P単独投与(総量120mg)したとき、好中球数の特異的な変化にどのような影響生じるかを調べた。

結果、 E_2 単独投与後4日目前後から好中球数の増加する特異的な変化が認められた。好中球数は E_2 投与量を増やすと量依存性に増加した。自然発情に最も近似した特徴が再現できたのは、 E_2 0.5~1.0mgを1回投与したときであった。 E_2 とP併用投与では、自然発情様の徴候は全く認められなかった。Pを併用投与すると、量依存的に E_2 投与による好中球の特有のパターンが崩れ、変動幅も小さくなった。P単独投与は、正常発情様徴候もなく、好中球数の増加と特異的な変化も全く認められなかった。以上の結果から、発情時に認められる好中球の増数にはエストロゲン、特に E_2 の存在が不可欠で、プロゲステロンは投与量に依存して抑制的に作用することが示された。

4. 好中球の遊走をもたらす状況がどのような組織の変化であることを明らかにするために、頸管部粘膜組織の組織学的観察を行なった。供試豚は卵巢摘出豚7頭で、そのうち3頭には1.0、0.8および1.0mgの E_2 をそれぞれ1回投与した。投与直前、投与後2、3、5、7および9日目の頸管第2皺壁部組織を子宮内膜バイオプシー器で採取した。エストロゲン投与による影響が最も強く、また、発情の再現性の高い E_2 投与による頸管部組織の経時的変化を説明する。投与後2日目から頸管部粘膜上皮細胞の増殖と、変形細胞(変形好中球)の粘膜固有層、粘膜下織への侵入が認められた。粘膜下織の血管は拡張していた。粘膜上皮細胞の増殖は5日目をピークに減弱しはじめたが、 E_2 1.0mg投与の2頭では9日目まで粘膜下織や固有層の血管の拡張と間質の疎造化が続き、変形細胞の浸潤や血管内の白血球も明瞭に認められた。以上の結果から、好中球遊走の主因はエストロゲン、特に E_2 であることが確認された。

5. indomethacin 製剤 (以下 ind と略す) 投与による無発情・無排卵豚の好中球数の変化を観察した。排卵期の豚に ind を投与すると無発情・無排卵状態が出現する。この機構は排卵に Prostaglandin が関与し、その合成が阻害されることに起因しているからだとされている。この時に内分泌的变化も合わせ出現することと頸管粘液中好中球数の変化とその関連性について検討した。

発情を繰り返している経産豚 6 頭を用いた。そのうち 4 頭に ind (1 日 690mg) を発情前 6 日、3 日、1 日からそれぞれ 7 日間投与した。投与は小麦粉に混ぜ経口投与とした。この時の排卵確認は直腸検査によった。ind 投与豚と ind 無投与豚の好中球数の変化を比較した。ind 無投与豚では ind 投与豚の約 4 倍から 40 倍の増数が認められた。ind 投与豚の血中 E_2 濃度は発情 2 日前から急激に減少するか、殆ど変化しなかった。その時の血中 P 濃度は低値であった。ind 投与豚は発情豚と同様な内分泌学的変化が認められなかった。ind 投与豚のうち、1 頭では、発情開始日に好中球数が僅かに増加したが、発情徴候は全く認められなかった。ind 投与豚の卵巢には無排卵性閉鎖卵胞と卵胞嚢腫が認められた。一方、ind 無投与豚は正常に排卵し、その後に正常な大きさの黄体形成を認めた。

以上、一連の実験は、豚の発情期に生起する頸管粘液好中球数の増加現象の内分泌学的機序を明らかにすることを目的とした。その結果、頸管粘液中への好中球数の増加と血中 E_2 濃度との関係が明確に示された。また、血中 E_2 値が高値に達すると、多数の好中球が頸管部組織中を上皮層表面へ向けて移動を開始することを示唆する組織像を確認することができた。この研究は、特に繁殖学領域での応用として発情期の確認と人工受精時の交配適期を確認するための新たな技術となる。血中エストロゲンによる好中球の子宮頸管部組織への選択的移動を誘起するケミカルメデエーターの解明は今後の研究課題である。

論文審査の結果の要旨

発情している動物は、種によって異なった徴候を示す。豚では、外陰部の充血・腫脹などとともに、子宮頸管粘液中に多数の好中球を遊走させてくるのが特徴である。この現象は、臨床的には以前から知られていたが、好中球出現の意義ならびに機序は、現在までほとんど調べられていない。一般に、局所への好中球の遊走は炎症時の特徴とされている。同じような現象が繁殖整理の 1 時期である発情期に、しかも豚の頸管粘液中に限って認められるのはきわめて興味深いことである。学位申請者は、この現象の意義と機序を解明する目的で一連の実験を行った。

第 1 章 繁殖周期に伴う頸管粘液中好中球数と外部徴候

繁殖周期に伴い頸管粘液中好中球数がどのように変動するかを観察した。正常に発情を繰り返している経産豚 2 頭について、発情、妊娠、分娩および授乳の全期間にわたり、毎日午前と午後の 2 回、頸管粘液中の好中球数を測定した。頸管粘液は、直径 1cm の塩化ビニール管を通して一定の大きさの綿棒を頸管第 2 皺壁部粘膜に接着させて採取した。この綿棒をリン酸緩衝液 1ml の中で洗浄した。こうしてできた細胞浮遊液を細胞数の算定に供した。発情期には外部徴候としての外陰部の充血と腫脹および雄許容反応を観察・記録した。その結果、多数の好中球が頸管粘液中に出現するのは、外部徴候が著明になっている発情日を含めた前後 1 週間以内であることがわかった。頸管粘液中好中球の増加の程度は、分娩直後の数日間を除いた他の時期の 2.5 倍から 15 倍にもなった。このことから、発情期の頸管粘液中に好中球が増加するのは、エストロゲン (卵胞ホルモン) の働きによるのであらうと考えた。分娩直後にもさらに著しい好中球の増数が観察されている。

この現象の機序は発情期のそれと異なると思われるので、以後の観察からは除かれている。

第2章 頸管粘液中好中球数、外陰部徴候および排卵時期の関係

発情時には外部徴候がはっきりしてくるとともに、卵胞の成熟と排卵が卵巣内部で起こっている。頸管粘液中の好中球数は、この過程のどこと最も関係が深いのかをさらに詳しく調べた。正常発情周期を示し、卵巣および子宮に臨床上異常のない経産豚7頭を用いた。このうち4頭については、2回の発情開始日を含む前後9ないし14日間、外部徴候と頸管粘液中好中球数を毎日記録した。残りの3頭は、排卵を確認し、その時間を推定する目的で交配後開腹し、卵巣観察後、卵管子宮部に生食液を灌流して卵子を収集した。これら3頭の血中プロゲステロンとエストロゲン濃度、抹消血白血球数も測定した。

はじめの4頭では、都合8回の発情期を観察した。その結果、頸管粘液中好中球数の増加は、外部徴候が非常に明瞭となる発情開始前日から発情開始翌日に起こり、その時間は24—36時間以内であった。また、同一固体では1回目と2回目の発情時に、同じ時間に同じ程度の好中球増加を示すもの(4頭中1頭)、異なる時間に異なった程度の増数を示すもの(4頭中1頭)があった。それらの固体の時間的ずれは24時間以内であった。

排卵確認のために用いた3頭は、雄許容反応が現れてから36時間以内に1または2回の交配を行った。1頭はそれから28時間後に開腹し、3—4細胞期となっている受精卵5個を確認した。他の1頭は15および25時間後の2回の開腹で確認できず、約30時間後のと殺により、2細胞期8個が採取できた。また残り1頭では、38時間後の開腹で卵子1個を採取したものの、受精卵と判定し得なかった。文献によれば、受精後、2細胞期となるまでに14—19時間、4細胞期までには24時間必要とされている。このことから推測すると、受精卵がかくにんできた供試豚の排卵は、発情開始後それぞれ28および38時間目である。この時間帯は頸管粘液中好中球数のピーク時と重複または極めて接近している。

この3頭の血中エストロゲン濃度は、発情開始2—3日前より上昇しはじめ、発情開始ないし推定排卵日に向けて低下した。プロゲステロン濃度は、発情開始前日または開始日から推定排卵日に向けて軽度上昇し始めていた。頸管粘液中好中球数のピーク時は、エストロゲン濃度が低下し、プロゲステロン濃度が軽度上昇し始めるときにあっていた。頸管粘液中好中球数と血中白血球数との間には明瞭な関係が見いだせなかった。

以上の観察から、頸管粘液中好中球数の増加は、発情期の中でも短い時間に限定されており、排卵および血中エストロゲン/プロゲステロン濃度と密接に関連していることが明らかとなった。

第3章 卵巣摘出豚に疑似発情を起こさせたときの外部徴候および頸管粘液中好中球数

次に、卵巣を除去し、外因性にエストロゲンやプロゲステロン(P)を投与するとどうなるかを調べた。この実験によって、自然発情豚と同様に、頸管粘液中に好中球が増加してくるか否かを観察したのである。エストロゲンとして estrone (E_1)、estradiol-17 (E_2) および estriol (E_3) を使用した。 E_1 および E_3 を投与した卵巣摘出豚には、自然発情のときと同じ程度の頸管粘液中好中球の増加が認められなかった。最も自然発情に類似した外部徴候と好中球反応を示したのは低用量(0.5—1.0mg)の E_2 を1回投与したときであった。この条件でPを併用投与すると、投与量に依存して特有の好中球増数パターンが崩れ、増数幅も小さくなった。P単独投与では、外部徴候も頸管粘液への好中球出現もまったくみられなかった。この結果、発情時に観察される頸管粘液中への好中球の遊走にはエストロゲン、とくに E_2 の存在が不可欠であること、およ

びプロゲステロンは投与量に依存して好中球遊走を抑制することが明らかとなった。

第4章 自然発情および疑似発情豚の頸管部粘膜組織の形態変化

頸管粘液への好中球遊走が、どのような組織変化のもとで起きているのかを知るため、自然発情豚および疑似発情豚の頸管第2皺壁部生検組織を調べた。

自然発情豚では、発情開始直前から上皮層が厚くなり、ここに変形好中球が進入してきていた。この像は上皮層の厚さが減少した発情4日目でもなお顕著であった。粘膜下織への変形好中球の浸潤は発情前から認められ、発情4日目でも明瞭であった。発情中は粘膜固有層にも変形好中球の浸潤が強く、血管の拡張や組織の疎造化もみられた。E₂投与した卵巢摘出豚でも、投与2日目から上皮細胞の増殖と、変形好中球の粘膜固有層、粘膜下織への進入が認められた。E₂が増加すると(1mg)、このような組織変化が延長して観察された。プロゲステロンの投与では、こうした組織変化がみられなかった。

以上の成績から、頸管粘液の好中球は、拡張し壁が薄くなった血管から遊出し、疎造化した組織間隙を遊走して来たと考えられる。これを誘導しているのはエストロゲン、とくにEであろうと推察した。

第5章 頸管粘液中好中球の遊走に及ぼす Indomethacin および顆粒球コロニー形成刺激因子の効果

Indomethacin はプロスタグランジンの生合成を阻害する物質として知られている。発情誘起物質としてのプロスタグランジンF_{2α}が作られなければ、頸管粘液中への好中球遊走も起こらないはずである。Indomethacin はまた、非ステロイド系抗炎症薬として使われている。自然発情を繰り返している豚4頭と、卵巢除去した豚2頭にこれを投与し、外部徴候、頸管粘液中好中球の動態、血中エストロゲンおよびプロゲステロン濃度を観察した。

発情予定日の前後7日間、Indomethacin を投与した正常豚は雄許容反応を示さず、頸管粘液好中球数も増加しなかった。血中エストロゲンとプロゲステロン濃度は、それぞれ5 pg / ml および 1 ng / ml 以下で推移した。卵巢には無排卵卵胞があり、黄体は作られていなかった。卵巢除去豚に、Indomethacin を投与しながらE₂を与えたところ、1頭では外部徴候が現れ、頸管粘液中好中球の典型的な増数ピークが観察された。これらの反応と呼応して、上皮細胞層の増殖、血管拡張、粘膜下織および粘膜固有層の間質の疎造化、変形好中球の増数などが、頸管部組織でみられた。他の1頭ではこうした顕著な反応がすべて起こらなかった。卵巢摘出豚にE₂1mgを投与した後、顆粒球コロニー形成刺激因子(G-CSF)を注射したところ、頸管粘液中好中球数は増加し、増加している期間も延長された。

本章の実験から、Indomethacin は自然発情を完全に抑制し、頸管粘液中好中球の増数も抑えることがわかった。しかし外因性に与えたE₂に対しては成績が分かれた。G-CSF は、頸管粘液への好中球遊走を増幅した。おそらくこの物質のもつ遊走能強化作用によると考えられる。

著者は本研究によって、豚の発情時の特徴である頸管粘液への好中球遊走の機序を明らかにしようと試みた。そしてこの現象にはエストロゲンが深くかかわっていること、発情時には頸管粘膜の下層から上層へ好中球が遊走してくることなどを明らかにした。この現象のより正確な発現機序は今後の研究に待たねばならないが、その基礎が著者によって築かれた意義は大きい。またこの成績は、豚の発情期の確認ならびに人工受精適期の判定などに応用できる点で、臨床繁殖学に寄与している。よって博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしい業績と評価する。