

氏名(本籍) ほん だ かず まさ
本 田 和 正

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 267 号

学位授与年月日 昭和59年3月8日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 哺乳期のラットにおける発情抑制機構に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 正木 淳 二 教授 津田 恒 之

助教授 菅原 七 郎

論文内容要旨

家畜では、分娩後の発情回帰と哺乳との間に密接な関係のあることが知られており、哺乳や搾乳の頻度が高いと分娩後の発情回帰が遅れることが報告されている。また、分娩後の発情回帰を早める試みも行われているが、この時期の繁殖生理に関する基礎的知見が不足しているため、必ずしも満足すべき結果は得られていない。

実験動物のラットにおいても、哺乳期の無発情が知られており、その誘因は乳子による吸乳刺激が主なものと考えられている。しかし、現在のところ、哺乳期における発情休止期間、ならびにこの間の下垂体前葉ホルモンや卵巣ホルモンの分泌を乳子数との関連で詳細に検討した報告は少ない。哺乳期のラットにおける発情抑制機構としては、吸乳刺激が視床下部一下垂体系のホルモンを介して影響を及ぼす経路と、卵巣のホルモンが介在する経路の2つが考えられるが、これらの経路が哺乳の時期や乳子数に関連してどのように作働しているかについても、十分に検討されていない。

以上から、本研究では泌乳と繁殖機能の関係に関する基礎的知見を得るために、ラットにおいて分娩後の発情休止状態を支配する要因を解析し、それらの相互関係を内分泌学および組織学的手法を用いて明らかにしようとした。

1. 哺乳期における発情回帰と血中ホルモンの動態

哺乳中の発情回帰を乳子数との関連で観察し、あわせて血中プロジェステロン、プロラクチンおよび性腺刺激ホルモン濃度をラジオイムノアッセイで測定した。

1) 哺乳期における発情休止期間は乳子数の増加に伴って延長した (Table 1)。一方、末梢血中プロジェステロン濃度は、泌乳5および10日では乳子数の増加に伴って低くなる傾向がみられたが、その後は乳子数の少ないものでは急激に減少した (Fig. 1-A)。泌乳10日における卵巣静脈血中プロジェステロン濃度は、乳子数が増加すると高くなり、末梢血中濃度とは逆の傾向を示した (Table 2)。

2) プロラクチン濃度は泌乳3日で最高値を示したが、以後は、いずれの群においても減少した。2匹哺乳群の値は、哺乳期を通して8匹哺乳群の値より低かった (Fig. 1-B)。

3) LHおよびFSH濃度は泌乳5日で低くなったが、乳期の進行に伴って、乳子数が多いほどLH濃度は低く (Fig. 1-C)、またFSH濃度が上昇する時期は遅れる傾向を示した (Fig. 1-D)。

4) 以上の結果から、哺乳期における発情休止期間は、乳子数の増加に伴って延長することが明らかとなったが、これは、吸乳刺激の強さが性腺刺激ホルモン分泌の抑制、およびプロラクチンとプロジェステロン分泌の促進の度合に影響したことによるものと推察された。

Table 1 Intervals from parturition to the first estrus in lactating rat

| No. of pups | Mean intervals (Day) |
|-------------|--|
| 12 | 26.2 [*] ± 1.1 ^b (6) |
| 8 | 22.3 ± 1.1 ^a (6) |
| 4 | 20.8 ± 1.3 (6) |
| 2 | 17.3 ± 1.3 (6) |

* : Mean interval ± standard error. Number in parentheses indicates number of animals used. Significantly different from the group nursing 2 pups (a : p < 0.05, b : p < 0.01).

Table 2 Peripheral and ovarian venous plasma progesterone levels on day 10 of lactation in the rat

| No. of pups | Peripheral plasma (ng/ml) | Ovarian venous plasma (µg/ml) |
|-------------|--|-------------------------------|
| 8 | 13.2 [*] ± 1.0 ^a (4) | 2.51 ± 0.69 (4) |
| 4 | 18.9 ± 3.9 (4) | 1.23 ± 0.68 (4) |
| 2 | 25.3 ± 4.1 (6) | 0.73 ± 0.09 (6) |

* : Mean ± standard error. Number in parentheses indicates number of animals used. a : Significantly different from the group nursing 2 pups (p < 0.05).

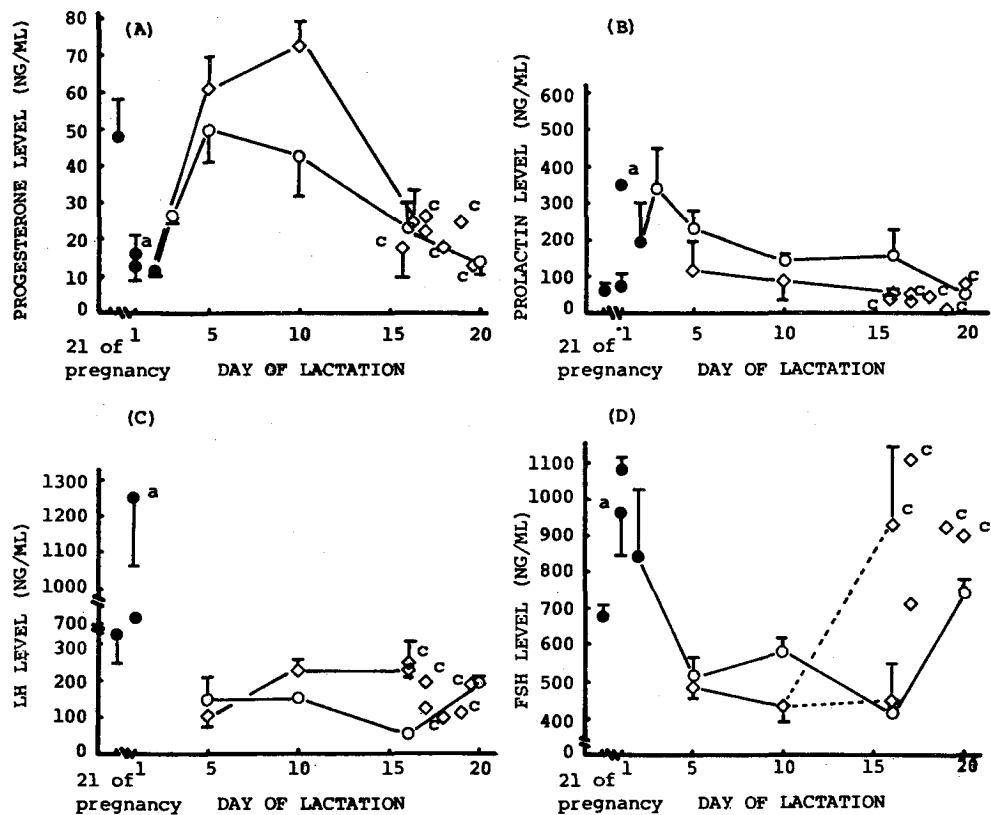


Fig. 1 Serum levels of progesterone (A), prolactin (B), LH (C) and FSH (D) during lactation in rats nursing 8 pups (○) and 2 pups (◇).
 a : post-partum ovulation was observed at autopsy. c : These animals showed the vaginal smear of estrus and had been ovulated.

2. 哺乳期のラットにおける乳子除去と発情回帰との関係

哺乳期無発情の発現に、持続的な吸乳刺激が必要であるかどうかを調べるために、哺乳期の種々の時期に乳子除去した場合の発情休止期間と卵胞発育を乳子数との関連で検討した。

1) 0~24時間哺乳群では、乳子数に関係なく分娩後5, 6日で発情が回帰した。72時間哺乳群では、乳子数2匹以下で乳子除去後3日、乳子数4匹以上では乳子除去後4日でそれぞれ発情が回帰した (Fig. 2)。72時間哺乳群における乳子除去時の直径 $550\mu m$ 以上の卵胞数は、乳子数が多いほど少なく、乳子除去後も乳子数が多い群の卵胞発育は遅れる傾向を示した (Fig. 3)。

2) 分娩後5, 7および10日における乳子除去後の発情休止期間は, 12匹哺乳群が2匹哺乳群よりも明らかに延長したが (Fig. 4), 発情休止期間の延長した群においても, 乳子除去後2または3日で典型的な発情前期の膣垢像を示す動物が高頻度で出現した。12匹の乳子を10日間哺乳したラットでは, 乳子除去時に550 μ m以上の卵胞は認められなかったが, 乳子除去後2日で急激な増加が認められた (Fig. 5)。

3) 以上の結果から, 吸乳刺激を分娩後5日間以上続けると, 乳子除去後の発情休止期間が, 乳子数と強い関連性をもって延長することが明らかとなった。また, 12匹哺乳群で発情休止期間の延長した個体でも, 乳子除去後直ちに発情排卵過程の開始する動きがみられたが, 結局は, 抑制機構が働いて, これが実現しないものと考えられた。

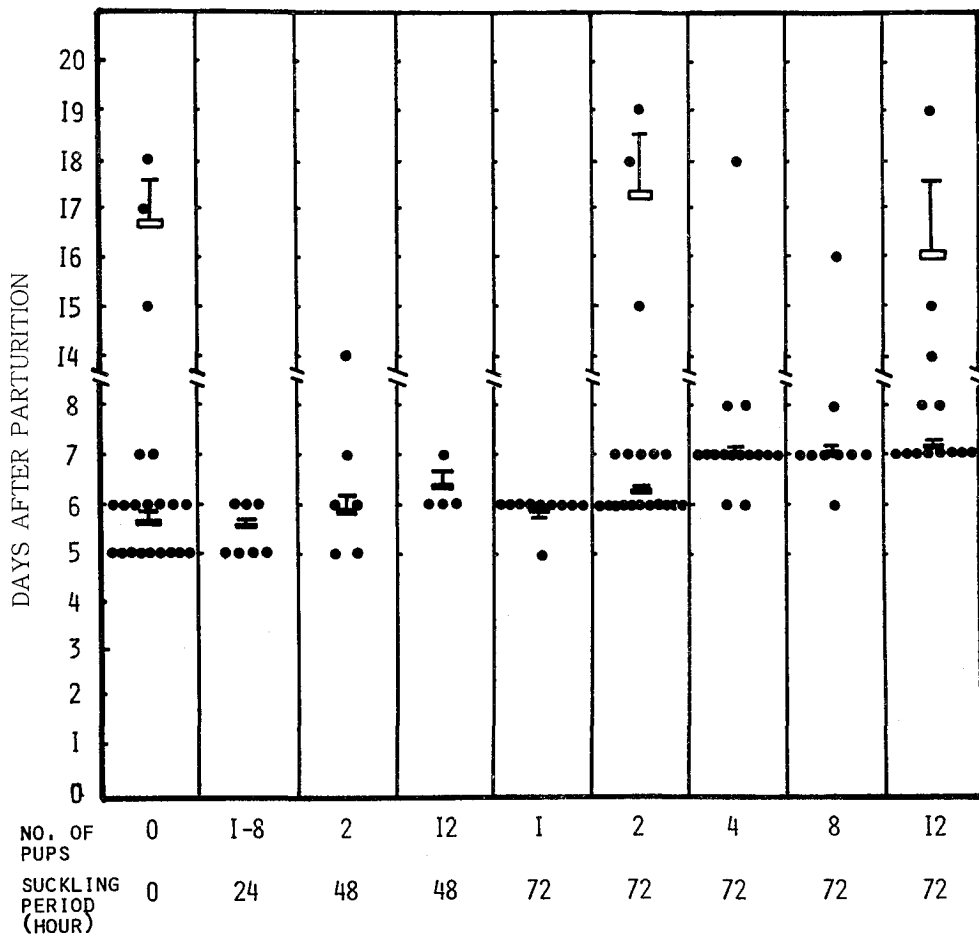


Fig. 2 The relation between the number of pups or suckling period and the interval to the first estrus after parturition. Closed circle indicates the value of individual animal. $\bar{\square}$: S.E.M. of the animals which returned to estrus within 8 days after parturition. \square : S.E.M. of the animals which showed the pseudopregnancy like diestrus period.

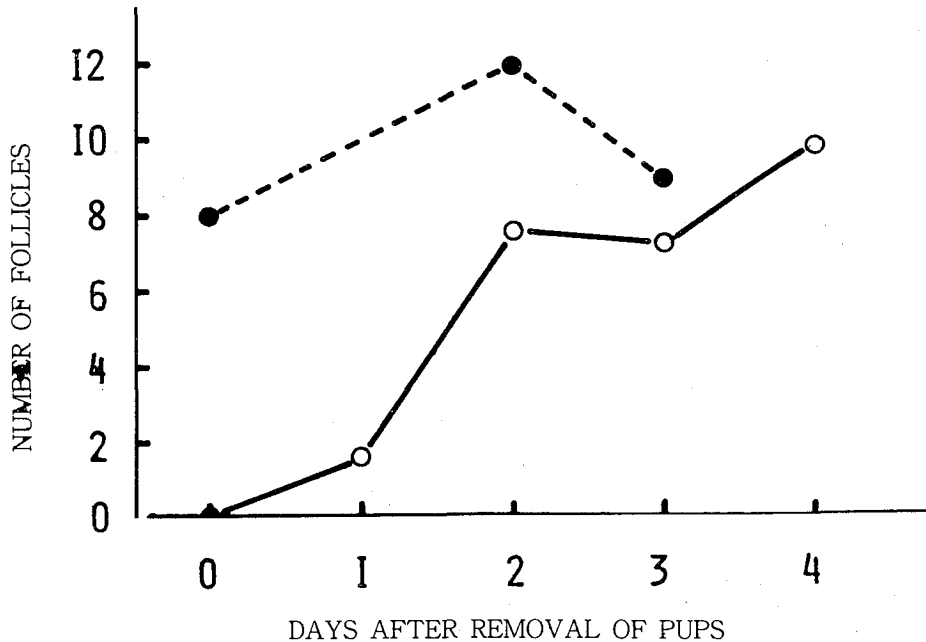


Fig. 5 The change of the number of follicles larger than $550\mu\text{m}$ in diameter after removal of pups on day 10 of lactation. —○— : 12 pups. ---●--- : 2 pups.

3. 哺乳期のラットにおける乳子除去と血中ホルモンの動態 および外因性ホルモンとの関係

乳子除去後の発情休止期間延長に深い関連があると考えられる血中ホルモンの変動および外因性ホルモン投与の効果を調べ、乳子除去後の発情休止期間延長の機構について検討した。

1) 10日哺乳ラットの乳子除去後2または3日目における外因性LHに対する排卵反応は、 $5\mu\text{g}$ 以上のLH投与の場合、12匹哺乳群と2匹哺乳群の間に有意差は認められなかった (Table. 3)。10日哺乳ラットの乳子除去後2または3日目において、2匹哺乳群では明らかなLHサージが認められたが、12匹哺乳群では基礎値を維持するにとどまった (Fig. 6)。

2) 10日哺乳ラットの乳子除去後2または3日目におけるLHRH投与後の排卵率は、12匹哺乳群のほうが2匹哺乳群よりも低かった (Table. 4)。また、LHRH投与後の血中LH濃度の上昇も12匹哺乳群のほうが2匹哺乳群よりも小さかった (Fig. 7)。

3) 10日哺乳ラットの12匹哺乳群では、血中プロジェステロン濃度が乳子除去後6日まで高値を維持し (Fig. 8)、血中プロラクチン濃度は偽妊娠ラットで認められているパターンとよく似た変動を示した (Fig. 9)。

4) 以上の結果から、多数の乳子を哺育したラットにおいても、乳子除去後直ちに発情・排卵への一連の過程が開始されるが、これらのラットでは乳子除去後の下垂体のLHRHに対する反応性が極めて低く、また、乳子除去後偽妊娠状態が誘起されるために、発情休止期間が延長するものと考えられた。

Table 3 Ovulatory responsiveness to ovine LH 2 or 3 days after removal of pups on day 10 of lactation.

| Dose of LH (μ g) | Cycling rats | | Lactating rats | | | |
|-----------------------|--------------|--------------------|------------------|---------------------------------|---------|-------------------|
| | | | 2 pups | | 12 pups | |
| 0.0 | 0/10 | | | | | |
| 0.5 | 0/3 | | | | | |
| 1.0 | 3/3 | 5.7 \pm 2.2* (3) | 6/6 ^a | 10.8 \pm 0.9 (6) | 1/5 | 9.0 (1) |
| 5.0 | | | 6/6 | 11.2 \pm 0.7 ^b (6) | 6/10 | 5.7 \pm 1.2 (6) |
| 10.0 | | | 10/10 | 10.7 \pm 0.5 (10) | 8/9 | 9.8 \pm 1.0 (8) |

* : Mean number of tubal ova \pm standard error in ovulated animals. Number in parentheses indicates number of animals. Significantly different from the group nursed 12 pups (a : $p < 0.05$, b : $p < 0.01$).

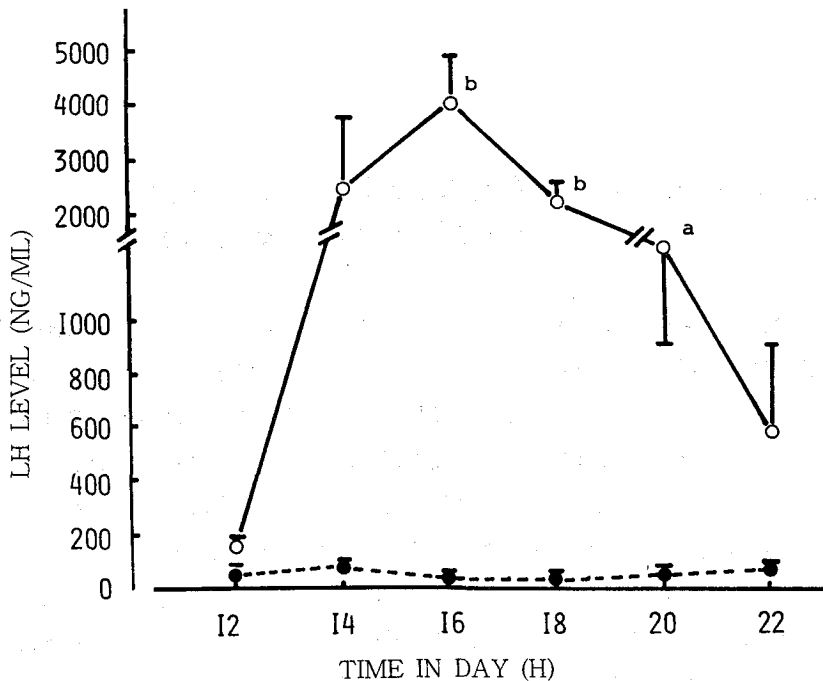


Fig. 6 Serum LH levels 2 or 3 days after removal of pups on day 10 of lactation in the rat nursing 12 pups (●) and 2 pups (○). The mean value of 3 to 6 animals was indicated in each plot. Vertical line indicates standard error of mean value. Significantly different from the value at 12:00 h (a : $p < 0.05$, b : $p < 0.01$).

Table 4 Ovary responsiveness to exogenous LHRH 2 or 3 days after removal of pups on day 10 of lactation

| Dose of LHRH (ng) | Cycling rats | | Lactating rats | | | |
|-------------------|------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|---------|-------------|
| | | | 2 pups | | 12 pups | |
| 0 | 0/7 | | | | | |
| 1-10 | 0/8 | | | | | |
| 100 | 6/8 ^a | 7.8±1.8* (6) | 6/ 7 ^b | 11.2±2.1 (6) | 0/5 | |
| 500 | 7/9 ^a | 11.0±0.4 (7) | 11/12 ^b | 10.6±0.3 (11) | 1/8 | 2.0 (1) |
| 1000 | 2/2 | 10.5±0.5 (2) | 3/ 3 | 7.3±3.2 (3) | 1/5 | 12.0 (1) |
| 2000 | 6/6 ^b | 10.5±0.8 ^b (6) | 5/ 5 ^a | 13.0±0.5 ^b (5) | 2/8 | 2.5±0.5 (2) |
| 4000 | | | | | 1/4 | 10.0 (1) |
| 8000 | | | | | 2/4 | 4.5±2.5 (2) |

* : Mean number of tubal ova + standard error in ovulated animals. Number in parentheses indicates number of animals. Significantly different from the group nursed 12 pups (a : p < 0.05, b : p < 0.01).

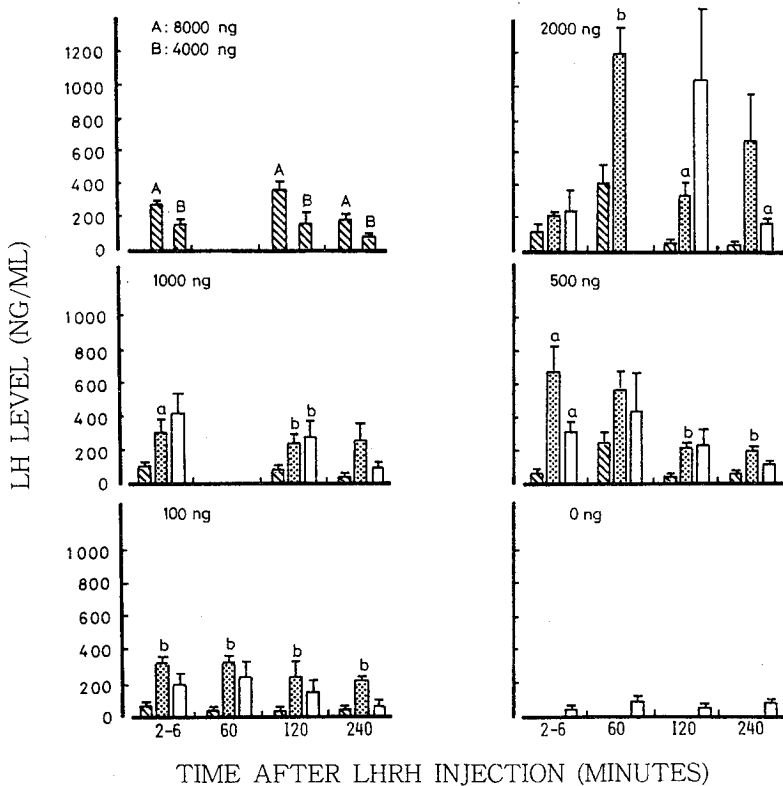


Fig. 7 Serum LH levels following LHRH injection 2 or 3 days after removal of pups on day 10 of lactation in the rat nursing 12 pups (▨) or 2 pups (▩) and in the cycling pro-estrous rat (□). Each value was indicated with the mean of 3 to 8 animals. Vertical line indicates standard error of mean value. Significantly different from the group nursed 12 pups (a: p < 0.05, b: p < 0.01).

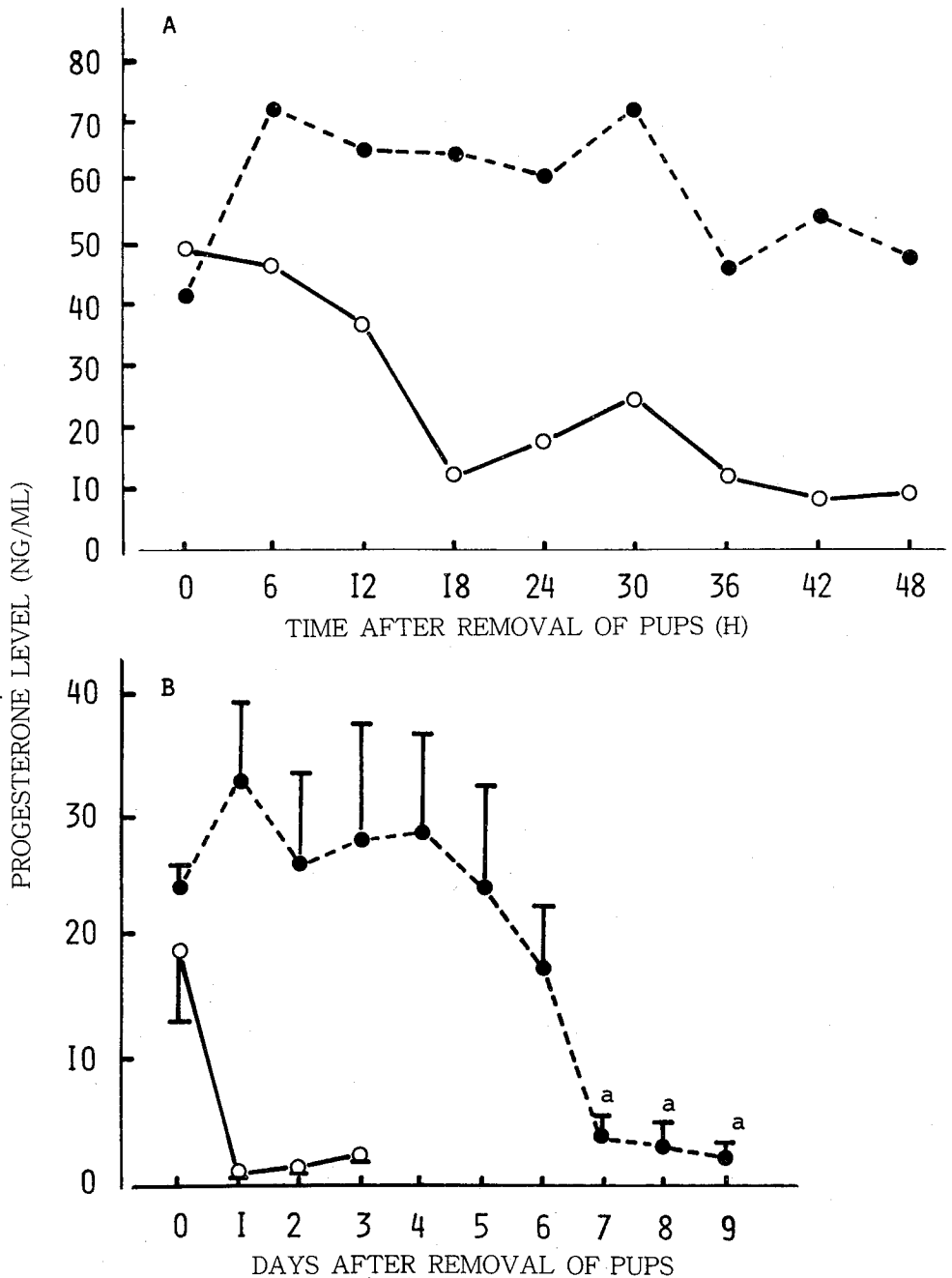


Fig. 8 Serum progesterone levels after removal of pups on day 10 of lactation in the rat nursing 12 pups (●) and 2 pups (○). A : The value of pooled sample from 6 to 21 animals until 48 h after removal of pups. B : The mean value of 3 to 4 animals until 9 days after removal of pups. Vertical line indicates standard error of mean value. a : Significantly different from the value at day 0 ($p < 0.05$).

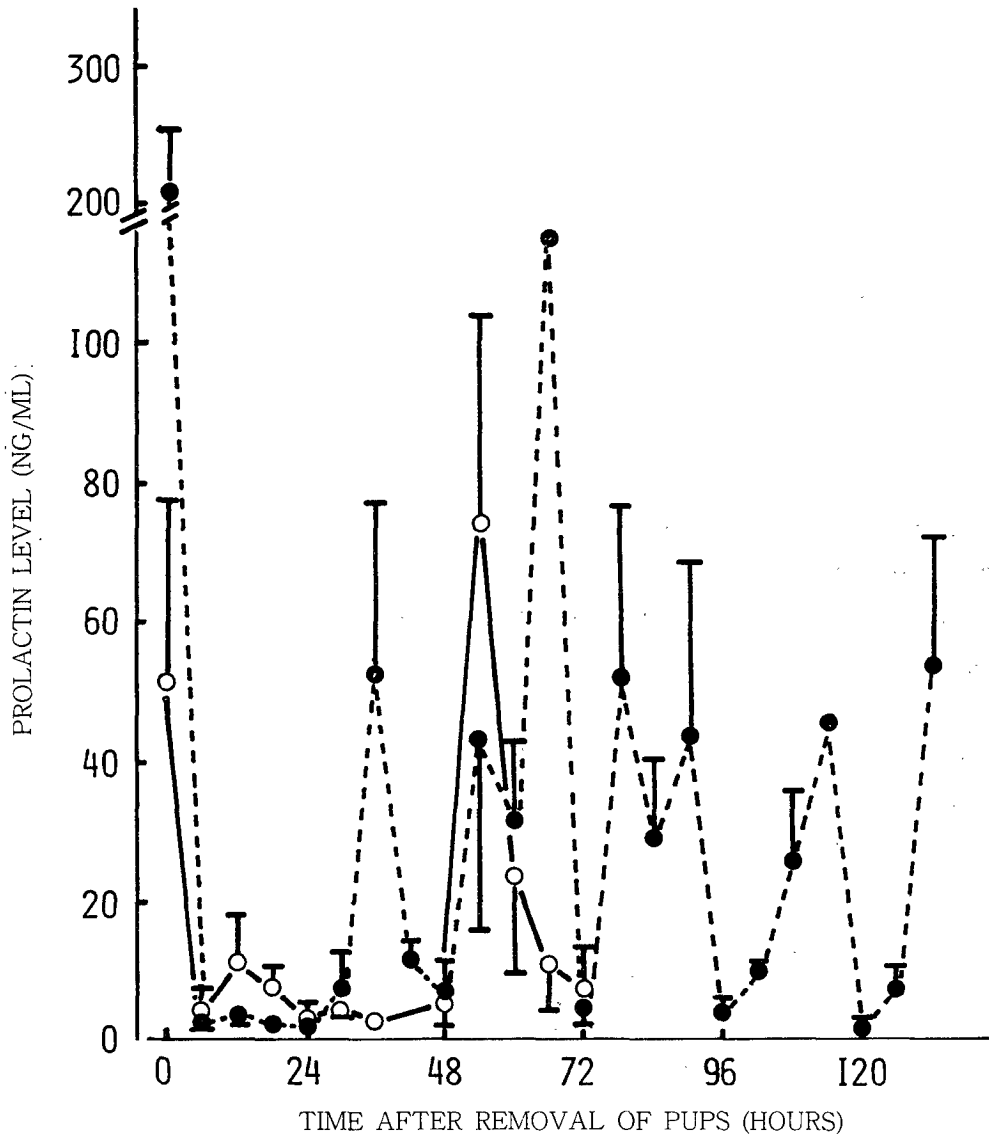


Fig. 9 Serum prolactin levels following removal of pups on day 10 of lactation in the rat nursing 12 pups (●) and 2 pups (○). The mean value of 2 to 4 animals was indicated in each plot. Vertical line indicates standard error of mean value.

4. 哺乳期のラットにおける哺乳黄体の有無と発情回帰

吸乳刺激による直接的な性腺刺激ホルモン抑制作用と卵巣プロジェステロンを介する抑制作用を区別し、両者の相互関係を明らかにするために、抗LH血清で後分娩排卵を抑制した哺乳ラットの血中プロジェステロン濃度と発情休止期間について検討した。

1) 12匹および2匹哺乳群とも抗LH血清処理で発情休止期間が有意に短縮し、2匹哺乳群の値は、分娩後哺乳させなかった群の発情休止期間と等しくなった (Table. 5)。プロジェステロン濃度は哺乳乳子数に関係なく抗LH血清処理ラットでは実験期間中低値 (5.6ng/ml 以下) を維持した (Fig. 10)。抗LH血清処理ラットの卵巣には、妊娠黄体が認められただけで哺乳黄体は存在しなかった。

2) 抗LH血清処理した12匹哺乳ラットにプロジェステロンを分娩後16日まで投与し、分娩後10日で乳子を除去すると、乳子除去後6日までは血中プロジェステロン濃度が高く、乳子除去後の発情休止期間が延長した。プロジェステロン処理を分娩後10日で中止すると、翌日に血中プロジェステロン濃度が減少し、乳子除去後3日で発情が回復した (Table. 6, Fig. 11)。

3) 以上の結果から、強い吸乳刺激による哺乳期発情は、泌乳前半では吸乳刺激依存型であり後半に卵巣プロジェステロン依存型に移行すると考えられた。一方、弱い吸乳刺激が加えられた場合は、卵巣プロジェステロン依存型の発情休止期間のみが出現すると結論された (Fig. 12, 13)。

以上、本研究は、吸乳刺激の強さや哺乳の時期に応じて性腺刺激ホルモンの分泌調節に関与する要因が異なることを明らかにしたものであり、哺乳期のラットにおける発情抑制機構に新知見を加えたものとする。

Table 5 Diestrous period in lactating rats received single injection of anti LH serum immediately after parturition

| No. of pups | Treatment | No. of animals | Diestrous period (Day) | Body weight of pups(g/litter) |
|-------------|-----------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 12 | A-LH | 9 | 15.4 \pm 1.4 ^a | 173.4 \pm 6.2 |
| 12 | Cont | 6 | 26.2 \pm 1.1 | 162.5 \pm 13.2 |
| 2 | A-LH | 6 | 6.5 \pm 0.2 ^a | 18.0 \pm 1.4 |
| 2 | Cont | 6 | 17.3 \pm 1.3 | 18.8 \pm 2.2 |
| 0 | A-LH | 4 | 6.0 \pm 0.4 | |
| 0 | Cont | 6 | 6.7 \pm 1.4 | |

Anti LH serum (0.4 ml) was injected intravenously immediately after parturition in the rat delivered between 10:00 h and 19:00 h. Body weight of pups on day 5 of lactation and on day 10 of lactation were indicated in the rats nursing 2 pups and in the rats nursing 12 pups, respectively. A-LH : Anti ovine LH serum. Cont : Control. * : Mean \pm standard error. a : Significantly different from the value in each control ($p < 0.01$).

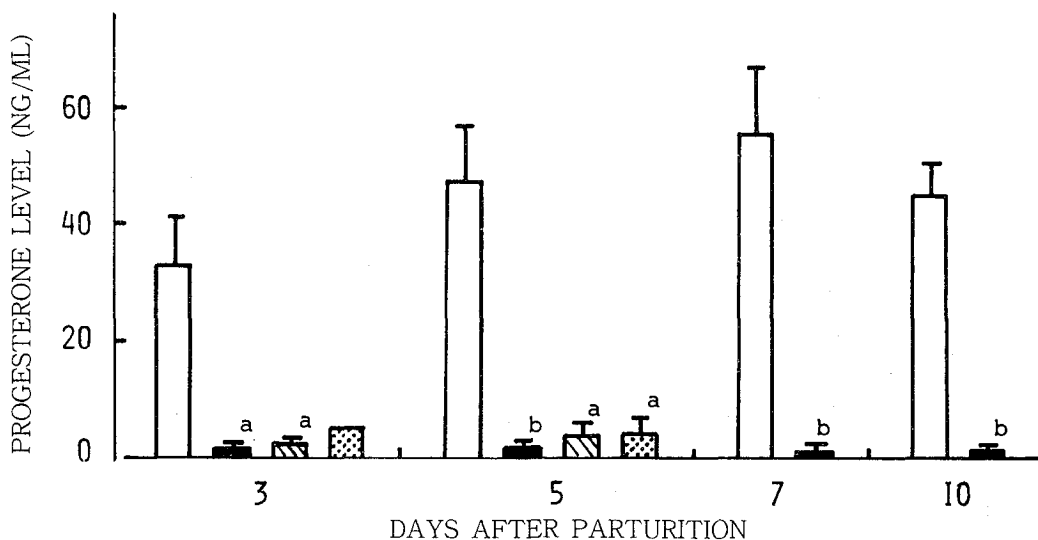


Fig. 10 Serum progesterone levels in lactating rats received single injection of anti LH serum (A-LH) immediately after parturition. □: Control rats nursing 12 and 2 pups. ■: A-LH treated rats nursing 12 pups. ▨: A-LH treated rats nursing 2 pups. ▩: A-LH treated rats of which pups were removed immediately after parturition. Significantly different from the value in each control (a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$). Vertical line indicates standard error of mean value.

Table 6 Diestrous period following removal of pups on day 10 of lactation in the rat which received single injection of anti ovine LH serum immediately after parturition

| Treatment | No. of animals | Diestrus after removal of pups (Day) | Body weight of pups (g/litter) |
|-------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| A-LH P (Day 3-10) | 7 | 3.4 ± 0.2^a | 189.4 ± 4.4 |
| A-LH P (Day 3-16) | 6 | 8.7 ± 1.0 | 192.5 ± 7.9 |
| NRS | 4 | 10.3 ± 0.5 | 201.5 ± 12.9 |

Anti ovine LH serum or normal rabbit serum (0.4 ml) was injected intravenously immediately after parturition in the rats delivered between 10:00 h and 19:00 h. Progesterone (2 mg/0.2 ml of sesame oil) was injected subcutaneously twice a day (10:00 h and 22:00 h) between days 3 and 10 of post-partum or between days 3 and 16 of post-partum. The body weight of pups was indicated at removal of pups. A-LH: Anti ovine LH serum. P: Progesterone. NRS: Normal rabbit serum. a: Significantly different from NRS group ($p < 0.01$). *: Mean \pm standard error.

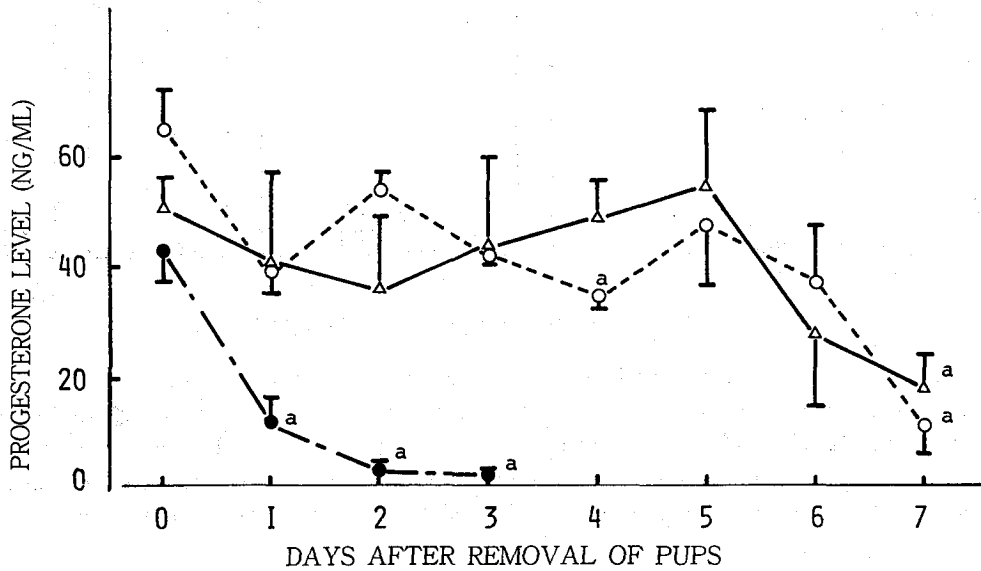


Fig. 11 Serum progesterone levels following removal of pups on day 10 of lactation in the rat which received single injection of anti LH serum (A-LH). A-LH was injected intravenously immediately after parturition in the rat delivering between 10:00 h and 19:00 h, and progesterone (2 mg/0.2 ml of sesame oil) was injected subcutaneously twice a day (10:00 h and 22:00 h) from day 3 to 10 (●) or to day 16 (△) post-partum. Control rats received normal rabbit serum alone instead of A-LH (○). Vertical line indicates standard error of mean value. a : Significantly different from the value at day 0 in each group ($p < 0.05$).

lactational anestrus

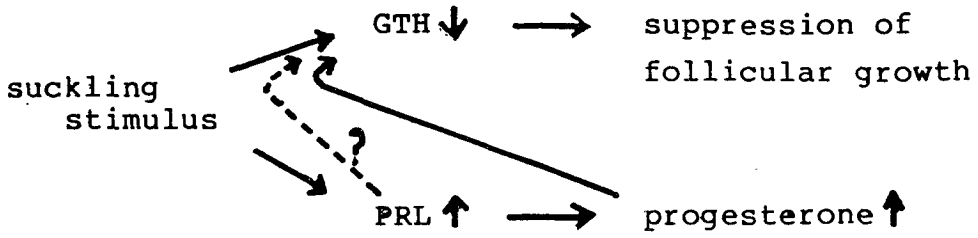
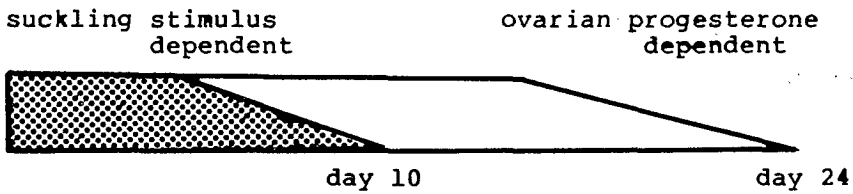


Fig. 12

strong suckling stimulus



weak suckling stimulus

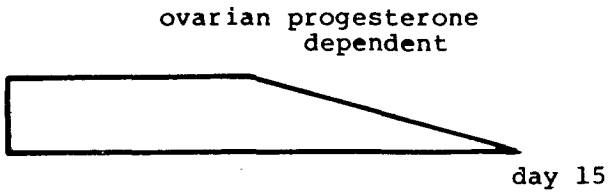


Fig. 13

審査結果の要旨

哺乳期のラットにおける発情抑制機構には、吸乳刺激が直接、視床下部・下垂体系のホルモンを介する経路と、卵巢のホルモンを介する経路が関与している。本研究は、これら2経路が作動する条件を、乳子数および泌乳の時期との関連で明らかにしようとした。

まず、ラットの哺乳期における発情休止期間は、乳子数の増加に伴って延長することを確認し、これは吸乳刺激の強さが性腺刺激ホルモンの分泌抑制と、プロラクチンおよびプロジェステロンの分泌促進に影響したためであることを示した。

次に、吸乳刺激を分娩後5日間以上続けた場合、乳子除去後の発情休止期間は、乳子数が多いものほど延長することを見いだした。さらに、10日間哺乳を続けたラットでは、性腺刺激ホルモン放出ホルモンに対する下垂体の反応性が低下しており、また偽妊娠状態が誘起されていることを見いだした。

本研究では、吸乳刺激による直接的な性腺刺激ホルモン抑制作用と、卵巢プロジェステロンを介する間接的な抑制作用を識別するため、抗黄体形成ホルモン血清を調製し、これによって後分娩排卵を抑制した哺乳ラットを用いることを試みた。これらのラットについて血中プロジェステロン濃度と発情休止期間の関係をしらべた結果、強い吸乳刺激による哺乳期無発情の場合は、泌乳期前半では吸乳刺激依存型であり、後半に卵巢プロジェステロン依存型に移行することを示す成績を得た。これに対し、弱い吸乳刺激が加えられた場合は、もっぱら卵巢プロジェステロン依存型の発情休止期間のみが出現するとの結論を得た。

以上、本研究は吸乳刺激の強さや哺乳の時期に応じて性腺刺激ホルモンの分泌調節経路が変わる可能性があることを明らかにしたものであり、哺乳期のラットにおける発情抑制機構に新知見を加えた。分娩後の無発情は多くの家畜でみられる現象でもあり、本研究は家畜繁殖学の領域に貢献するところが大きく、農学博士の学位を授与するに値すると判定した。