発生初期におけるブタ卵子の estradiol-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性について

石 田 一 夫・新 村 末 雄

新潟大学農学部, 新潟市 950-21

(1977. 3. 22 受付)

ハムスター, ラット, ウサギなどの実験動物の卵子に各種の hydroxysteroid dehydrogenases (HSD) が組織化学的に検出されたことから, これらの動物の卵子においてステロイドホルモンの合成が行われていることが示唆されている¹⁻¹²⁾. しかし, 家畜の卵子についてはブタで2, 3の報告が見られるに過ぎない. すなわち, Flood¹³⁾は妊娠10日から19日のブタの胞胚について Δ^5 -3 β -HSD (基質として DHA を使用), β -3 β -HSD (3 β -hydroxy-5 β -androstane-17-one), 17 β -HSD (estradiol-17 β , testosterone) の組織化学的検出を試み, いずれのHSDも妊娠10日の胞胚には現われなかったが, 12日以降の胞胚には出現することを報告した. 著者ら¹⁴⁾は妊娠1日, 4日, 8日および13日のブタの卵子について Δ^5 -3 β -HSD (基質として DHA を使用) を組織化学的に検出し, 酵素活性はいずれの発生段階の卵子にも見られることを報告した. estradiol-17 β -HSD は estrogen の代謝に関係している酵素で, ブタでは妊娠10日から19日の胞胚について検出が試みられているが¹³⁾, それ以前の発生段階の卵子については調べられていない. 本実験は1細胞期, 4細胞期および胞胚期のブタの卵子について estradiol-17 β -HSD を組織化学的に検出し, estrogen の合成能を検討したものである.

材料および方法

供試動物として大ヨークシャー (体重約 120 kg) 3 頭およびランドレースとハンブシャーの F₁ (体重約 160 kg) 1 頭を用いた. これらのブタは適宜種付し, 交配した翌日を妊娠第1日 (Day 1) とした. 卵子の採取は卵管と子宮をロック液でかん流して行った. 採取した卵子

の日齢と発生の段階は次の通りである. すなわち, Day 1 の卵子は1細胞期, Day 4 は4細胞期, Day 8 は胞胚初期, Day 13 は胞胚伸長期であった.

酵素を検出するための基質液の組成は DICKMANN と DEY¹⁾の使用した処方に準じた. すなわち, estradiol-17 β 1.8 mg, NAD 4.0 mg, nitro-BT 2.0 mg, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 10 ml で, 基質はあらかじめ 0.5 ml のアセトンに溶解して使用した. また, 基質を除いた液を対照として用いた. なお, HSD の組織化学的反応は NADH- または NADPH- 脱水素酵素に依存しているので, これらの酵素を BARKA と ANDERSON の方法¹⁵⁾に従って検出した. Day 1, Day 4 および Day 8 の卵子は基質液にそのまま浸漬したが, Day 13 の伸長した胞胚は細かく切って浸漬した. 浸漬は 37°C で 90 分間行った. 処理した卵子はあらかじめワセリン・パラフィンをカバーガラスの四隅に位置するように置いたスライドガラスの中央に移し, カバーガラスをかぶせ, 静かに押して卵子を圧した.

結 果

卵子を基質液に浸漬すると細胞質にジホルマザン顆粒の沈着が見られた (第1図 a, b, c). この顆粒は基質を除いた液に浸漬した卵子には現われなかった (第1図 d). したがって, ジホルマザン顆粒は酵素活性によって生じたものであることが確認された. Day 1 の1細胞卵子においては, ジホルマザン顆粒は細胞質に充満している脂肪小滴の間に少量観察された (第1図 a). Day 4 の4細胞卵子においても, この顆粒は分割球の細胞質に含まれている脂肪小滴の間に少量観察された. Day 8 の胞

Estradiol-17 β -hydroxysteroid Dehydrogenase Activities in Pig Embryos during the Early Stages of Development: Kazuo ISHIDA and Suetō NIIMURA (Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata-shi 950-21)

第1図 a, b および c は estradiol-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を示している卵子で, d は基質を除いた液に浸漬した卵子 (対照) である. DICKMANN と DEY の方法 (1973). $\times 250$. a. 1細胞卵子 (Day 1), b. 胞胚 (Day 8), c. 胞胚の一部 (Day 13), d. 1細胞卵子 (Day 1)

胚においては, ジホルマザン顆粒は胚結節, トロホプラスト共に細胞質に一樣に相当量分布しており, 両者の間に量的差異は見られなかった (第1図 b). 透明帯はいずれの時期においても反応しなかった. Day 13 の胞胚では, この顆粒はトロホプラストの細胞質に一樣に多量分布していたが, 細胞によって顆粒の量に若干の違いが観察された (第1図 c). ジホルマザンの沈着量から推察すると, estradiol-17 β -HSD の活性は1細胞期や4細胞期では弱い, 胞胚期では強い傾向が見られた.

NADH- および NADPH-dehydrogenase の活性はいずれの時期の卵子においても検出された.

考 察

PERRY と HEAP¹⁶⁾ および PERRY ら¹⁷⁾ は妊娠 10 日から 16 日までのブタの胞胚について DHA および androstenedione から estrogen への転換を生化学的に調べ, これらの転換は妊娠 10 日の胞胚には見られないが, 妊

娠 14 日以降のものには存在していることを報告した. 一方, estradiol-17 β -HSD については, FLOOD¹³⁾ が妊娠 10 日から 19 日のブタの胞胚を用いて組織化学的検出を試み, 妊娠 12 日以降の胞胚に酵素活性が出現することから, この時期の胞胚は estrogen を合成していることを示唆した.

以上のように, ブタの卵子における estradiol-17 β -HSD の組織化学的検出は FLOOD¹³⁾ によって胞胚期のものについて行われたが, 本実験において1細胞期および4細胞期の卵子についても調べたところ, 酵素活性はこれらの発生段階の卵子に弱いながら認められた. また, FLOOD¹³⁾ は妊娠 10 日の胞胚には酵素活性は見られないと報告しているが, 本実験の妊娠 8 日の胞胚にはかなり強い活性が観察された. すなわち, 本実験において1細胞卵子 5 例, 4細胞卵子 4 例, 妊娠 8 日の胞胚 4 例, 妊娠 13 日の胞胚 5 例について estradiol-17 β -HSD の検出を試みたところ, FLOOD の成績¹³⁾ とは異なり, この酵素

はいずれの時期の卵子にも例外なく検出された。したがって、本実験の結果からは、ブタの卵子における estrogen の合成は1細胞期と4細胞期においてもわずかではあるが行われており、胞胚が形成されると活発化し、胞胚の伸長期にはかなり盛んであるように推察された。

本研究は昭和51年度文部省科学研究費 (No. 156178) の援助によって行ったものである。

文 献

- 1) DICKMANN, Z., and S. K. DEY, J Reprod Fert 35: 615-617. 1973.
- 2) DICKMANN, Z., and S. K. DEY, J Endocr 61: 513-514. 1974.
- 3) DICKMANN, Z., and S. K. DEY, J Reprod Fert 37: 91-93. 1974.
- 4) DICKMANN, Z., and J. S. GUPTA, Devel Biol 40: 196-198. 1974.
- 5) DEY, S. K., and Z. DICKMANN, Endocrinology 95: 321-322. 1974.
- 6) DEY, S. K., and Z. DICKMANN, Steroids 24: 57-62. 1974.
- 7) DICKMANN, Z., S. K. DEY, and J. S. GUPTA, Proc Nat Acad Sci USA 72: 298-300. 1975.
- 8) DICKMANN, Z., S. K. DEY, and J. S. GUPTA, Anat Rec 181: 346-347. 1975.
- 9) 新村末雄・石田一夫, 家畜繁殖誌 22: 13-17. 1976.
- 10) 新村末雄・石田一夫, 家畜繁殖誌 22: 55-59. 1976.
- 11) NIIMURA, S., and K. ISHIDA, J Reprod Fert 48: 275-278. 1976.
- 12) 新村末雄・石田一夫, 日畜会報 48: 173-176. 1977.
- 13) FLOOD, P. F., J Endocr 63: 413-414. 1974.
- 14) 石田一夫・新村末雄, 未発表.
- 15) BARKA, T., and P. J. ANDERSON, Histochemistry, 296-333. Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers. New York. 1965.
- 16) PERRY, J. S., and R. B. HEAP, Acta Endocr Suppl 177: 178. 1973.
- 17) PERRY, J. S., R. B. HEAP, and E. C. AMOROSO, Nature 245: 45-47. 1973.