ウシにおける各種繁殖条件下の血中卵胞刺激ホルモン濃度

森 純一・富塚常夫・中西雄二*・井内民師**・仮屋堯由

(農林水産省畜産試験場)

性腺の機能発現には下垂体から分泌される性腺刺激ホルモンすなわち卵胞刺激ホルモン (FSH) および黄体形成ホルモン (LH) が重要な役割を果たしており、機能発現機構の解明や機能異常の発生原因の究明あるいは治療法確立のためには、これらホルモンの動態がくわしく調べられていることが望ましい。近年、ホルモンの微量測定法としてラジオイムノアッセイ (RIA) 法が開発されたことから、多くのホルモンについて血中濃度の変動が細かく検討出来るようになった。家畜の性腺刺激ホルモンのうち、LH についても、RIA 法によってその測定が可能となり、著者ら¹⁾も本法によって各種繁殖条件下のウシの血中 LH 濃度を測定し、その動態を明らかにしてきた。しかし、FSH についてはホルモンの精製が困難なことから、高純度の精製標品が得難く、また RIA に適した抗血清が作製し難いことなどによって、RIA の開発は著しく遅れており、海外の特定研究室から測定成績が発表されているに過ぎない²⁻⁷⁾。

著者ら⁸⁾は、これ迄ヒツジ FSH を抗原とした抗血清を作製し、これを用いた FSH のホモログス RIA 法やヒトあるいはラットの FSH を標識抗原としたヘテログス RIA 法の検討を行ってきた。しかし、いずれの方法によっても、家畜の血中 FSH 濃度の測定が行える段階には至らなかった。一方、近年 CHENG^{9,10)}は NIH-FSH-S1 の 164 倍の力価を有する高純度の精製ウシ FSH 標品の作出に成功し、さらに本抗原とその抗血清によって、ウシの血中 FSH 濃度の測定法を確立した。最近、これらの抗血清および精製ホルモンを入手する機

会を得たので、本報告では各種繁殖条件下のウシの血中 FSH 濃度を測定し、その結果をとりまとめた。なお、CHENG の RIA 法はホルモンのヨード化を酵素法によって行っているが、本実験ではヨード化をクロラミン T 法によって行った。

材料および方法

供試動物および測定材料: 農林水産省畜産試験場養育の正常発情周期を示す成雌牛 10 頭、卵胞囊腫牛 10 頭、雌子牛 12 頭、成雄牛 7 頭を供試した。このうち雌子牛は月齢 6 カ月以下のものである。品種は大部分がホルスタイン種であったが、一部黒毛和種および褐毛和種も用いた。血中 FSH 濃度測定のための採血は、原則として供試牛 1 頭につき 1 回に限ったが、発情周期牛については、発情期のほか非発情期に同一牛から反復して採血を行い、結果のとりまとめを行った。このうち、発情周期中の経日変化をしらべるためには、4 頭の供試牛から 24 時間間隔で連日、さらに 1 頭のウシについては、発情期前後の血中 FSH 濃度の微細変化をしらべるために、2 時間間隔で 84 時間に亘って採血を行った。これらのウシについては随時発情徴候の観察および直腸検査を行い、発情状態ならびに卵胞の発育変化を観察するとともに、排卵の確認を行った。血液はいずれも頸静脈からヘパリン血として採取し、直ちに冷却遠心により血漿を分離して、測定まで -20°C に保存した。

FSH の RIA: FSH の測定は CHENG⁹⁾によって開発されたホモログス RIA 法によった。すなわち、標識用の抗原はウシ下垂体前葉から抽出・精製された高純度の FSH 標品で、NIH-FSH-S1 の 164 倍の力価を有するものである。また、抗 FSH 血清は本標品を抗原とし、ウサギを免疫動物として作製した抗ウシ FSH 免疫ウサギ血清を用いた。これら標識用抗原および抗血清はともに CHENG により供与されたものである。また、標識用の放射性ヨードとしては ^{125}I (New England Nuclear 製) を、FSH の標準品としては NIH-FSH-B1 (米国、NIAMDD) を使用した。

抗原の標識は CHENG の原法とは異なり、クロラミン

*流動研究員: 所属、農林水産省九州農業試験場畜産部
**依頼研究員: 所属、徳島県肉畜試験場

Plasma levels of follicle stimulating hormone in cattle under various reproductive states.

MORI, Junichi, Tsuneo TOMIZUKA, Yuji NAKANISHI*, Hitoshi IUCHI** and Takayoshi KARIYA (National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi P. O. Box 5, Ibaraki 305, Present address: *National Kyushu Agricultural Experiment Station, **Tokushima Prefectural Meat Animal Experiment Station)

Japan. J. Anim. Reprod., 28 (1), 1982.

Fig. 1. Elution pattern of ¹²⁵I from Sephadex G-50 column following iodination of bovine follicle stimulating hormone (b-FSH).

T 法¹⁰⁾によった。すなわち、放射性ヨード化のためには精製 FSH 標品 2 μ g の溶液に 0.5 M 磷酸緩衝液 25 μ l を加え、さらに ¹²⁵I 1 mCi を加えて攪拌し、これに 15 μ l のクロラミン T 溶液 (2 μ g/ μ l 0.05 M 磷酸緩衝液) を加えて 1 分間反応させ、その後 50 μ l のメタ重亜硫酸ナトリウム溶液 (2.4 μ g/ μ l 0.05 M 磷酸緩衝液) を添加、混合して、反応を停止させた。次に、放射性ヨード化ホルモンを遊離の放射性ヨードと分離するために、

Sephadex G-50 によるカラムクロマトグラフィー (10 $\times$ 150 mm) を行った。溶出液はあらかじめ 1 ml の 1% セラチン加 0.05 M 磷酸緩衝液を加えておいた試験管に 10 滴ずつ分割採取した。その後各フラクションの放射能を測定し (図 1 参照)、2 つのピークのうち最初のを標識ホルモンの分画として使用した。標識ホルモン溶液の作製には、最初のピークに相当する試験管の内容物を、0.1% セラチン加 0.05 M 磷酸緩衝液中に滴加し、100 μ l の放射活性が 30,000 cpm になる様に調整して使用した。次に、抗血清を 1:400 正常ウサギ血清加エチレンジアミン 4 酢酸ナトリウム磷酸緩衝食塩液で倍数希釈し、それぞれの希釈倍率における抗血清と放射性ヨード化ホルモンの結合率を求め、その結果から、本実験では 30,000 倍に希釈した抗血清を使用した。測定は試料血漿の 0.1 ml 宛を用いて 2 抗体法で行い、第 2 抗体としては当研究室で作製したウサギ γ -グロブリン免疫ヤギ血清を用いた。それぞれの反応時間は原法とほぼ同様である。標準品には NIH-FSH-B1 を用い、血中 FSH 濃度は血漿 1 ml 当りの ng 相当量で表示した。本測定系における標準曲線の 1 例は図 2 に示す通りであった。

結 果

発情周期中におけるウシの血中 FSH 濃度の変化：発情周期中における血中 FSH 濃度の経日変化を 4 頭の供

Fig. 2. Standard curve for bovine FSH radioimmunoassay.

Fig. 3. Mean plasma levels of FSH in four cows bled daily throughout the estrous cycle. Each point represents mean $\pm$ SEM. Day 0 represents the day of estrus.

Fig. 4. Plasma levels of FSH around estrus in a cyclic cow bled at 2 h intervals.

試牛について調べた結果は図3の通りであった。すなわち、非発情期には若干の日間変動が認められるが、大きな変化はなく低値で経過したのち、発情期に著しく上昇してピークを示し、その後再び下降してもとの低値にもどり、以後の非発情期には大きな変動もなく経過した。これらの変化のうち、発情期におけるピーク値は、周期中の非発情期のすべての平均値に対して統計的に有意に高く、また非発情期における平均値の間にはいずれも統計的な有意差は認められなかった。

さらに、採血間隔を短縮して発情期前後に2時間間隔で採血を行い、血中 FSH 濃度の変化を追跡した成績は

図4の通りであった。すなわち、発情開始 4~6 時間後から FSH 濃度は急上昇を始め、10 時間後にピークに達し、その後急速に下降してもとのレベルにもどり、以後小さきまの変動を続けながら経過した。本例における血中 FSH 濃度上昇の持続時間はほぼ 10 時間で、排卵はピークから 26 時間後に確認された。

各種繁殖条件下におけるウシの血中 FSH 濃度：前述の発情周期を示す成雌牛のほか、卵胞囊腫牛、雌子牛および成雄牛についての測定結果は表1の通りであった。このうち発情周期牛については、前述の結果から全測定値を発情期と非発情期の2群に分けて成績のとりまとめ

Table 1. Plasma levels of FSH in cattle under various reproductive states (Mean $\pm$ SEM)

Reproductive state	No. of samples	Plasma FSH (ng/ml)
Cycling cow-at estrus	15	354.8 $\pm$ 74.8
-not at estrus	141	115.7 $\pm$ 5.2
Cow with cystic follicles	10	234.7 $\pm$ 48.6
Calf	12	42.3 $\pm$ 12.2
Bull	7	123.0 $\pm$ 49.8

を行った。結果は発情周期牛の発情期には 354.8 $\pm$ 74.8 ng/ml と著しく高く、それ以外の非発情期には 115.7 $\pm$ 5.2 ng/ml と低い値を示した。また、卵胞嚢腫牛では 234.7 $\pm$ 48.6 ng/ml と発情周期牛の非発情期に比較して高く、雌子牛では 42.3 $\pm$ 12.2 ng/ml と著しく低い値を示した。一方、成雄牛では 123.0 $\pm$ 49.8 ng/ml で発情周期牛の非発情期より若干高い値を示したが、統計的な有意差は認められなかった。

考 察

本実験における発情周期中の血中 FSH 濃度は、発情期に急激に上昇して一過性の鋭いピークを形成した。先に著者ら¹⁾は、発情周期中における血中 LH 濃度の経日変化を測定し、発情期に単峰性のピークが形成されることを報告した。その際に求めた血中 LH 濃度の変化と本実験における血中 FSH 濃度の変化を対比すると、発情期に鋭いピークを形成し、非発情期には発情期に比較して相対的に低い値で経過するという両者類似の傾向を示した。これらの結果はこれまでの AKBAR *et al.* その他の報告^{2,3,5,6)}と一致するものであった。ただ、非発情期における FSH の日間変動は LH に比べて大きく、また測定値の個体変動も LH に比べて FSH の方が大きい傾向が見られた。このように、発情期に FSH と LH の血中濃度が急上昇するのは、排卵に先立って下垂体から FSH および LH が大量に放出される結果と考えられる。発情期におけるこのような下垂体からの性腺刺激ホルモンの大量放出は、牛下垂体中の性腺刺激ホルモンの変動を測定したこれまでの報告¹¹⁻¹³⁾からも裏づけられている。このように、発情期に LH とともに血中 FSH 濃度が急上昇するという事実は、近年注目されているように、FSH が LH とともに排卵誘起に重要な役割を果たしている¹⁴⁾可能性を示唆するものと考えられる。

さらに、発情期前後に 2 時間間隔で採血を行い、血中 FSH 濃度の変化を調べた成績では、FSH ピークは発情開始 10 時間後にあらわれ、FSH 濃度上昇の持続時間はほぼ 10 時間で、排卵はピークから 26 時間後に確認さ

れた。ここに得られた発情開始後 ピークまでの時間、FSH 濃度上昇の持続時間およびピークから排卵までの時間はこれまでに LH について報告された結果^{15,16)}と著しく異なるものではなかった。

さらに、L'HERMITE *et al.*¹⁷⁾、SALAMONSEN *et al.*¹⁸⁾ および PANT *et al.*¹⁹⁾ らはヒツジの発情期前後の血中 FSH 濃度の経時変化を調べ、発情期の LH と重なるピークのほかに、約 24 時間おくて第 2 のピークが存在することを報告している。この第 2 のピークは非常に明瞭で、その出現は時期的にはほぼ排卵の時期に相当しているという。しかし、本実験における供試牛では、2 時間間隔で採血した例においても、また、予備実験において発情期前後に採血頻度を増して検討した例においても、このような第 2 のピークの存在をうかがわせるような変動を見出すことは出来なかった。一方、DOBSON⁵⁾はさらにウシについて、第 1 のピークの約 24 時間後を中心に血中 FSH 濃度が上昇することを報告している。このピークはヒツジの場合のように急峻かつ明瞭なものではなく、緩やかな勾配を示すものであった。本実験は測定例数も多くないので、FSH の第 2 のピーク、あるいは排卵前後における上昇の有無については今後さらに検討を続ける予定である。

血中 FSH 濃度の比較において、卵胞嚢腫牛は発情周期牛の非発情期のものに比較して高い値を示した。卵胞嚢腫牛の発生原因としては、子宮感染²⁰⁾や高泌乳²¹⁾あるいは濃厚飼料多給による過肥²²⁾などが引きがねとして考えられているが、直接の原因としては下垂体の機能異常、ことに FSH の分泌過剰あるいは LH の分泌低下が考えられている²³⁾。しかし、著者らの知る範囲では、卵胞嚢腫牛の血中 FSH 濃度を測定した成績は見当らず、本実験において、卵胞嚢腫牛が高い血中 FSH 濃度を示した事実は、興味ある結果である。ただ、本実験で測定を行った試料は、卵胞嚢腫発症途次における血液材料ではなく、卵胞嚢腫発症後のものである。FSH 濃度の上昇が卵胞嚢腫発症の原因とするためには、本症発生前後の血液材料について測定を行いその因果関係を明ら

かにすることが必要であらう。

雌子牛の測定結果は発情周期牛の非発情期に比較して低い値を示した。さきに Lee *et al.*²⁴⁾ はヒトの幼児期から成人に至るまでの血中 FSH 濃度の変化を調べ、生後 9~12 才齢までは、FSH も LH もともに低い値を示すが、それ以後は上昇して、13~16 才齢以降は高い値を示すことを報告している。そして、これらの急激なホルモン変化の時期と性成熟の時期の間に密接な関連のあることを示した。一方、Goldman *et al.*²⁵⁾ はラットにおいて、ヒトとは逆に性成熟前の血中 FSH 濃度が性成熟後のそれよりむしろ高い値を示すことを報告し、動物種によって成熟にともなう血中 FSH 濃度の変化の傾向に差異があることを示している。ウシについてのこの種の報告は少ないが、Gonzalez-Padilla *et al.*²⁶⁾ は雌牛の初発情前後の血中 FSH 濃度の変化を日を追って調べ、初発情の前後で特に変化が認められなかったことを報告し、また、Akbar *et al.*²⁾ も性成熟前と後の雌牛では、血中 FSH 濃度に差がない結果を得ている。本実験において、雌子牛が低い値を示した理由は、材料牛に性成熟期には間がある幼齢牛が多かったことも一因かもしれない。

成雄牛では非発情期の成雌牛に比べて若干高い平均値を示したが、統計的な有意差は認められなかった。雌雄における血中 FSH 濃度の傾向は、Akbar *et al.*²⁾、Cheng *ら*⁹⁾ のこれまでの報告と合致するものであった。

なお、本実験における測定値は同じ測定法による Cheng⁹⁾ の成雌牛および成雄牛の血中 FSH 濃度の測定値に比べて相当高い値を示した。この理由については不明であるが、今後検討の必要があらう。

要 約

各種繁殖条件下におけるウシの血中 FSH 濃度を測定し、次の成績を得た。

1. 成雌牛の発情周期中における血中 FSH 濃度の経日変化では、排卵前の非発情期には若干の日間変動を示しながら低値で経過し、発情期に至って急激に上昇してピークを示したのち、その後の非発情期を前記と同様の値で経過することが明らかとなった。そして、発情期における測定値の全平均は 354.8 ± 74.8 (平均値 $\pm$ 標準誤差) ng/ml で、それ以外の非発情期の全平均は 115.7 ± 5.2 ng/ml であった。

2. 発情期前後に 2 時間間隔で採血した測定成績ではピークは発情開始 10 時間後にあらわれ、FSH 濃度の上昇持続時間はほぼ 10 時間で、ピークから 26 時間後に排卵が確認された。

3. 卵胞囊腫牛の平均値は 234.7 ± 48.6 ng/ml で、発情周期牛の非発情期に比較して高い値を示したが、発情期のそれより低い値であった。

4. 生後 6 カ月齢までの雌子牛の平均値は 42.3 ± 12.2 ng/ml で、成雌牛に比較して低い値であった。

5. 成雄牛の平均値は 123.0 ± 49.8 ng/ml で成雌牛の非発情期の平均値より若干高い値であったが、統計的な有意差は認められなかった。

謝 辞

本試験遂行にあたって有益な助言をいただいた群馬大学内分秘研究所若林克巳博士、国立がんセンター研究所長澤弘博士、農林水産省畜産試験場上家哲博士に深謝するとともに、貴重な精製ウシ FSH 標本および同抗血清を恵与下さったカナダ Manitoba 大学 Kwong-Wah Cheng 博士ならびに標準品として NIH-FSH-B1 を供与下さった米国国立衛生研究所 (NIAMDD, NIH) に深く感謝致します。

(1981. 9. 21 受付)

文 献

- 1) Mori, J., J. Masaki, K. Wakabayashi, T. Endo & T. Hosoda: *Theriogenology*, **1**, 131, 1974.
- 2) Akbar, A. M., L. E. Reichert, Jr., T. G. Dunn, C. C. Kaltenbach & G. D. Niswender: *J. Anim. Sci.*, **39**, 360, 1974.
- 3) Schams, D. & E. Schallenger: *Acta endocr.*, **81**, 461, 1976.
- 4) Dobson, H.: *J. Reprod. Fert.*, **52**, 45, 1978.
- 5) Dobson, H.: *J. Reprod. Fert.*, **52**, 51, 1978.
- 6) Cheng, K.-W.: *J. Endocr.*, **77**, 185, 1978.
- 7) Schams, D., E. Schallenger, Ch. Menzer, J. Stangl, K. Zottmeier, B. Hoffmann & H. Karg: *Theriogenology*, **10**, 453, 1978.
- 8) 森(純)・富塚(常)・辻村(信): 日畜会報, **50**(別), 60, 1979.
- 9) Cheng, K.-W.: *Biochem. J.*, **159**, 651, 1976.
- 10) Greenwood, F. C., W. M. Hunter & J. S. Glover: *Biochem. J.*, **89**, 114, 1963.
- 11) Rakha, A. M. & H. A. Robertson: *J. Endocr.*, **31**, 245, 1965.
- 12) Hackett, A. J. & H. D. Hafs: *J. Anim. Sci.*, **28**, 531, 1969.
- 13) 森(純)・藤崎(尚)・檜垣(繁)・細田(達): 本誌, **14**, 93, 1968.
- 14) 鈴木(善): 排卵機構と黄体相の調節, ホルモンと生殖 II (日本比較内分泌学会編), p. 65, 学会出版センター, 東京, 1979.
- 15) Schams, D. & H. Karg: *Acta endocr.*, **61**, 96,

- 1969.
- 16) HENRICKS, D. M., J. K. DICKY & D. G. NISWENDER: *Biol. Reprod.*, **2**, 346, 1970.
 - 17) L'HERMITE, M., G. D. NISWENDER, L. E. REICHERT, JR. & A. R. MIDGLEY, JR.: *Biol. Reprod.*, **6**, 325, 1972.
 - 18) SALAMONSEN, L. A., H. A. JONAS, H. G. BURGER, J. M. BUCKMASTER, W. A. CHAMLEY, I. A. CUMMING, J. K. FINDLAY & J. R. GODING: *Endocrinology*, **93**, 610, 1973.
 - 19) PANT, H. C., C. R. N. HOPKINSON & R. J. FITZPATRICK: *J. Endocr.*, **73**, 247, 1977.
 - 20) GARM, O.: *Acta endocr.*, Suppl., **3**, 1, 1949.
 - 21) CASIDA, L. & A. CHAPMAN: *J. Dairy Sci.*, **34**, 1200, 1951.
 - 22) 星(修)・山内(亮): 家畜臨床繁殖学(3版) p. 168, 朝倉書店, 東京, 1968.
 - 23) 山内(亮)・芦田(浄)・乾(純): 日本獣医学雑誌, **16**, 65, 1954.
 - 24) LEE, P. A., A. R. MIDGLEY, JR. & R. B. JAFFE: *J. clin. Endocrinol.*, **31**, 248, 1970.
 - 25) GOLDMAN, B. D., Y. R. GRAZIA, I. A. KAMBERI & J. C. PORTER: *Endocrinology*, **88**, 771, 1971.
 - 26) GONZALEZ-PADILLA, E., J. N. WILTBANK & G. D. NISWENDER: *J. Anim. Sci.*, **40**, 1091, 1975.

Summary

Plasma levels of follicle stimulating hormone (FSH) in cattle under various reproductive states were determined by a highly specific and sensitive radioimmunoassay recently developed by CHENG. Radioimmunoassay was run with purified bovine FSH (164×NIH-FSH-S1) and the specific antiserum to the FSH preparation raised in the rabbit. These materials were kindly donated by Dr. CHENG, University of Manitoba, Canada. Results were expressed in terms of NIH-FSH-B1 reference standard.

Plasma levels of FSH in cycling cows throughout the estrous cycle showed a peak at estrus (354.8 ± 74.8 ng/ml) and remained at basal range during remainder of the cycle (115.7 ± 5.2 ng/ml) (Fig. 3 and Table 1). The peak was sharp and monophasic and was observed 10 h after the onset of estrus with duration of about 10 h. Ovulation was detected 26 h after the peak (Fig. 4).

Levels of FSH were higher in cows with cystic follicles (234.7 ± 48.6 ng/ml) than in cycling cows not at estrus (Table 1) suggesting an imbalance secretion of FSH for the cause of the syndrome. FSH in female calves younger than 6 months of age stayed at very low levels (42.3 ± 12.2 ng/ml). FSH levels in bulls were 123.0 ± 49.8 ng/ml.