Plasma Concentrations of LH, Testosterone and Estradiol-17 β in Male Beagle Dogs

Toshio INABA, Noritoshi KAWATE, Junichi MORI,
Sentaro TAKAHASHI* and Osamu MATSUOKA*

*Department of Animal Reproduction, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai Osaka 591*

**Division of Comparative Radiotoxicology, National Institute
of Radiological Sciences, Chiba 260*

(Accepted for publication February 27, 1988)

Summary. Plasma concentrations of LH, testosterone, and estradiol-17 β in male beagle dogs were measured.

The following results were obtained.

1. During the first 14 days of life, the LH and testosterone levels of both sexes were significantly lower ($P < 0.001$) than those for mature male dogs. The testosterone level for male neonates was significantly higher ($P < 0.05$) than that for female neonates.

2. The level of LH increased with days of age and appeared constantly from 8 years through 13 years of age in male dogs. The level of testosterone increased with days of age and appeared constantly from 1 year through 10 years of age in male dogs. Thereafter, the level of testosterone declined gradually. In contrast, there was no effect of age upon the level of estradiol-17 β in mature male dogs.

3. No annual variation of LH nor testosterone concentration was observed in mature male dogs. **KEY WORDS:** DOG, LH, TESTOSTERONE, ESTRADIOL.

Jpn J Anim Reprod 34, 99-104, 1988

雄ビーグル犬の血中 LH, テストステロンおよび エストラジオール-17 β 濃度の動態

稲葉 俊夫・川手 憲俊・森 純一・高橋千太郎*・松岡 理*

大阪府立大学農学部家畜臨床繁殖学教室 〒591 堺市百舌鳥梅町 4-804

*放射線医学総合研究所内部被ばく研究部 〒260 千葉市穴川 4-9-1

雄動物の性機能推定の指標として、古くから雄性ホルモンの測定が行われてきた (West *et al.*, 1952)。しかし、精巣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、すなわち黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) 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、これらのホルモン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。しかし、イヌの FSH はもちろん LH についても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 (Boyns *et al.*, 1972;

DePalatis *et al.*, 1978)。

最近, LH 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, 本報告では出生から老化に至るまでの雄イヌ血中 LH 濃度を測定し, さらにテストステロン(T) およびエストラジオール-17 β (E₂) 濃度についても測定を行ない, その結果をとりまとめた。

材料と方法

供試動物 実験には同腹ビーグル犬(雄3頭, 雌2頭)を用いて出生日から14日まで2日間隔で1回ずつ頸静脈より採血した。さらに, 年齢3月~13年までのビーグル雄57頭を用いて, 午前11時から30分間隔で3回連続して橈側皮静脈より採血した。なお, 血液はヘパリン血として採取し, ただちに遠沈により血漿を分離して, 測定まで-20°Cに保存した。

LH の測定法 LH の測定は既報(森ら, 1982)の2抗体 RIA 法によった。すなわち, 標識抗原には高純度のウシ LH 標品(LER-1072-2)を, 抗血清としては抗ウシ LH ウサギ血清(GDN-225)を, 標準品には高純度のイヌ LH 標品(LER-1685-1)を使用した。

抗原の標識は前報(森ら, 1982)と異なり, 酵素法(Miyachi *et al.*, 1972)によった。すなわち, 放射性ヨード化のためには精製 LH 標品2 μ g の溶液に0.4M 酢酸緩衝液 25 μ l を加え, さらに ¹²⁵I (New England Nuclear 社製) 9.25 MBq を加えて攪拌し, これに 100 ng のラクトペルオキシダーゼ(Boehringer Mannheim 社製)と 0.0015% 過酸化水素水 5 μ l を加えて 5 分間反応させ, その後 1% アジ化ナトリウム水溶液 50 μ l を添加, 混合し

Fig. 1. Elution pattern of crude reaction mixture from Bio-Gel P-60 column following iodination of bovine luteinizing hormone (bLH).

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, Bio-Gel P-60 によるカラムクロマトグラフィー (10 $\times$ 100mm) を行なった。流出液はあらかじめ 1% BSA 加 0.05M 磷酸緩衝液を加えておいた試験管に 5 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 (Fig. 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。

本測定系における標準曲線の 1 例は Fig. 2 に示す通りであった。この標準曲線上の最小検出量は 20 pg であり, 本法の測定内変動係数は 6.8% を示した。なお, 雄成犬から採取した血漿を用いて, 段階希釈し, 作成した反応曲線は本標準曲線とほぼ平行性を示した。

Fig. 2. Standard curve for radioimmunoassay of canine LH (cLH). The points and vertical lines represent means $\pm$ SD of triplicate analyses.

テストステロンとエストラジオールの測定法 血中 T と E₂ の測定は既報(稲葉ら, 1977; Inaba *et al.*, 1983)の RIA 法によった。

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表わし, Student の *t* 検定で有意性を調べた。

結 果

新生子期におけるイヌの血中 LH とテストステロン濃度 新生子期の同腹犬における血中 LH と T 量を測定した。その結果, Fig. 3 に示した通り, 血中 LH 値は雌雄ともに出生日約 2 ng/ml を示し, 以後14日まで漸次減少を示した。血中 T 値は両性ともに出生日約 0.1 ng/ml を示し, 以後数日間は減少傾向を示したが, 生後10日頃より雄の血中 T 値は上昇を示し, 雌よりも高い値を示した。また雌雄ともに生後14日間の血中 LH と T 値は成熟雄イヌのそれに比べると, 有意に低値 ($p < 0.001$) を示した。

Fig. 3. Mean plasma levels of LH and testosterone in 3 male (●) and 2 female (○) dogs from Day 0 through Day 14.

Fig. 4. Plasma levels of LH, testosterone, and estradiol-17 β in male dogs at different years of age. The point and vertical lines represent means $\pm$ SEM of 3 to 9 dogs.

雄イヌの血中ホルモン濃度と加齢の関係 年齢3月～13年の雄イヌ57頭の血中LH、TおよびE₂量を測定した。その結果、Fig. 4に示した通り、血中LHとT値は両者ともに3月齢では低値を示し、1年以降10年までは高値それぞれ5～12 ng/ml、2～3 ng/mlを持続した。血中T値は年齢が10年を過ぎると減少傾向を示し、年齢13年では若齢犬のそれよりも有意に低い値($p < 0.001$)を示した。一方、血中LH値については1年以降8年まで

加齢とともに徐々に上昇する傾向を示したが、若齢犬と老齢犬の間には有意な差は認められなかった。

血中E₂値は年齢1年以降13年まではほぼ一定の値を示した(Fig. 4)。

雄イヌの血中LHとテストステロン濃度の季節変動 年齢4年の雄イヌ7頭を用いて、1年間における血中LHとT値の変化を調べた。その結果、Fig. 5に示したように、血中LHとT値のいずれにおいても年間を通して有意な変化は認められなかった。

Fig. 5. Annual variations in plasma levels of LH and testosterone in 4-year-old male dogs. The point and vertical lines represent means $\pm$ SEM of 7 dogs.

考 察

ヒト・モルモット・ラット等では雌に比べて、雄では出生時には血中Tが高く、このTが脳のサイクリック・センターを破壊し、性成熟後LHとTの周期的な変化が見られなくなると報告されている(Winter *et al.*, 1981)。イヌの場合には、出生直後から生後14日までは雄の方が雌よりも高い血中T値を示したが、雌雄の差はヒト・モルモット・ラット程大きくはなかった(Winter *et al.*, 1981)。Hart *et al.* (1979)の成績では雄イヌの出生直後の急激なT放出は認められておらず、本実験の結果とよく一致した。ラットでは出生直後(生後30分～2時間)にTの放出があると、Tの脳中枢へのネガティブ・フィードバック的作用により、下垂体のLH分泌が抑制されることが示唆されているが(Pang *et al.*, 1979)、今回行った生後14日までの実験結果からでは、イヌでは新生子期の血中LH量に雌雄の差は認められなかった。なお、本実験結果と比較できる新生子期イヌの血中LHの報告は見当らず、今後、採血間隔の短縮、採血期間の延長等を

行い、さらに検討していく必要があろう。

雄イヌの血中 LH および T 値と加齢の関係については、今までに報告された成績 (Taha and Noakes, 1982; Brendler *et al.*, 1983; 稲葉ら, 1986; Tsutsui *et al.*, 1987) をみると、血中 T 値は 3 月齢では低値を示し、性成熟とともに増加し、性成熟以降 10 年までは高値を持続することが示唆されている。本実験では生後 13 年に至るまでの雄イヌを用いて検討した結果、従来の成績に加えて、血中 T 値は 10 年を過ぎ加齢が進むと、減少する結果が得られた。一方、血中 LH 値は加齢とともに徐々に上昇する傾向を示したが、血中 T 値が減少し始める 10 年を過ぎる頃にはほぼ一定の値を示した。今回得たイヌ血中 LH 値を今までに報告されたイヌ LH 値と比較してみると、若齢犬の LH 値においては Jones and Boyne (1976), DePalatis *et al.* (1978), および DeCoster *et al.* (1984) の報告値に近い値を示した。老齢犬の血中 LH については本実験成績と比較できるイヌの報告は見当らない。老齢犬において、精巣からの T 分泌が減少すれば、脳中枢へのネガティブ・フィードバック作用が減少し、その結果、下垂体からの LH 分泌の上昇が想定されたが、本実験成績では LH の上昇は著明ではなく、下垂体が老化により血中 LH を上昇させる程の能力を有しないこと、あるいは、脳中枢を抑制すると言われている E_2 (Jones and Boyne, 1976) が老化しても作用し続けていることなどが考察される。雄イヌの精巣からは比較的多量の E_2 が分泌されていることが報告されている (Thompson *et al.*, 1983)。そこで、雄イヌの血中 E_2 値と加齢の関係を調べたところ、血中 E_2 値は年齢 1 年以降 13 年まではほぼ一定した値を得た。このことは、 E_2 による脳中枢への作用が年齢 13 年においても持続していることを示唆している。今回得た雄イヌの血中 E_2 値を今までに報告された雄イヌ E_2 値と比較してみると、年齢 13 年まで検討した報告は見当らないが、9 年までは Brendler *et al.* (1983) の報告に近い値を示した。ヒトの場合、今回得た雄イヌの成績と類似して、高齢 (80 歳前後) になると血中 T 値の減少が見られるが、精巣からの E_2 がネガティブ・フィードバックの調節を果していることが示唆されている (Muta *et al.*, 1981)。一方、老齢雄ラット (24 月齢) では視床下部からの LH-RH 分泌は変化しないが、下垂体からの LH パルスの頻度が減少しているという報告 (Zanisi *et al.*, 1987; Karpas *et al.*, 1983) があり、イヌにおいてもこの点について今後さらに検討する必要がある。

季節繁殖動物のヒツジでは雌の非繁殖期に雄の血中

LH と T 値の減少が報告されている (Langford *et al.*, 1987)。最近、周年繁殖と考えられているウシの精巣内分泌機能も季節変化を示すことが見出され (Peirce *et al.*, 1987)、長期間一定条件で飼育された赤毛ザルでもその季節的变化が保たれていることが知られている (Michael and Bonsall, 1977)。一方、雄イヌの血中 T 値の季節変動の有無については必ずしも見解が一致していない。すなわち、Falvo *et al.* (1980) は雑種成犬の血中 T 値は 8 ~ 9 月では他の月に比べて著しく高値を示したと報告している。一方、Taha *et al.* (1981) および著者らの前報 (稲葉ら, 1985) の成績では雄ビーグル犬の血中 T 値には季節変動は認められず、本実験の結果とよく一致した。これらの血中 T 値の報告に変動が生じた理由は明らかでないが、犬種による相違が一因かもしれない。これに関して、コヨーテは季節繁殖を示し、その精巣機能は冬期に最も活発となるが、コヨーテとイヌの交雑種では秋期に最も活発となることが報告されている (Gipson *et al.*, 1975; Mengel, 1971)。血中 LH 濃度の季節変動については、これまでの報告 (Falvo *et al.*, 1980) と同様に、本実験においても血中 LH 値の季節変動が存在するという証拠は得られなかった。

謝 辞

本実験の実施にあたり、LH-RIA のために貴重な高純度イヌ LH 標品および標識用抗原を恵与された米国 Emory 大学 L.E. Reichert 博士、同抗血清を恵与された米国 Colorado 大学 G.D. Niswender 博士に深甚の謝意を表します。

References

- Boyns AR, Jones GE, Bell ET, Christie DW, Parkes MF (1972) Development of a radioimmunoassay for canine luteinizing hormone. *J Endocrinol* 55: 279-291.
- Brendler CB, Berry SJ, Ewing LL, McCullough AR, Cochran RC, Strandberg JD, Zirkin BR, Coffey DS, Wheaton LG, Hiler ML, Borden MJ, Niswender GD, Scott WW, Walsh PC (1983) Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle: age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate. *J Clin Invest* 71: 1114-1123.
- DeCoster R, Beerens D, Dom J, Willemsens G (1984) Endocrinological effects of single daily ketoconazole administration in male beagle dogs. *Acta Endocrinol* 107: 275-281.

- DePalatis L, Moore J, Falvo RE (1978) Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. *J Reprod Fert* 52: 201-207.
- Falvo RE, DePalatis LR, Moore J, Kepic TA, Miller J (1980) Annual variations in plasma levels of testosterone and luteinizing hormone in the laboratory male mongrel dog. *J Endocrinol* 86: 425-430.
- Gipson PS, Gipson IK, Seclander JA (1975) Reproductive biology of wild canis (Canidae) in Arkansas. *J Mammal* 56: 605-613.
- Hart BL, Ladewig J (1979) Serum testosterone of neonatal male and female dogs. *Biol Reprod* 21: 289-292.
- Inaba T, Imori T, Saburi T (1983) Urinary estrogen levels during the menstrual cycle of the orangutan. *Jpn J Vet Sci* 45: 857-859.
- Inaba T, Matsui N, Shimizu R, Takahashi S (1985) Serum concentrations of free testosterone in beagle dogs. *Jpn J Anim Reprod* 31: 43-47 (in Japanese).
- Inaba T, Shimizu R, Imori T (1977) Radioimmunoassay for male canine plasma 4-androstenedione, testosterone and 5 α -dihydrotestosterone. *Jpn J Anim Reprod* 23: 63-71 (in Japanese).
- Jones GE, Boyns AR (1976) Inhibition by oestradiol of the pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the dog. *J Endocrinol* 68: 475-479.
- Karpas AE, Bremner WJ, Clifton DK, Seeiner RA, Dorsa DM (1983) Diminished luteinizing hormone pulse frequency and amplitude with aging in the male rat. *Endocrinology* 112: 788-792.
- Langford GA, Ainsworth L, Marcus GJ, Shrestha JNB (1987) Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. *Biol Reprod* 37: 489-499.
- Mengel RM (1971) A study of dog-coyote hybrids and implications concerning hybridization in *Canis*. *J Mammal* 52: 316-336.
- Michael RP, Bonsall RW (1977) A three year study of an annual rhythm in plasma androgen levels in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) in a constant laboratory environment. *J Reprod Fert* 49: 129-131.
- Miyachi Y, Vaitukaitis JL, Nieschlag E, Lipsett MB (1972) Enzymatic radioiodination of gonadotropins. *J Clin Endocrinol* 34: 23-28.
- Mori J, Tomizuka T, Kariya T, Riu S (1982) Peripheral plasma concentrations of FSH and LH around estrus and ovulation in the heifer. *Jpn J Anim Reprod* 28: 194-199 (in Japanese).
- Muta K, Kato K, Akamine Y, Ibayashi H (1981) Age-related changes in the feedback regulation of gonadotrophin secretion by sex steroids in men. *Acta Endocrinol* 96: 154-162.
- Pang SF, Caggiula AR, Gay VL, Goodman RL, Pang CSF (1979) Serum concentrations of testosterone, oestrogens, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male and female rats during the critical period of neural sexual differentiation. *J Endocrinol* 80: 103-110.
- Peirce ARJ, Downey BR, Sanford LM (1987) Seasonal changes in plasma concentrations of prolactin, LH, FSH, and testosterone in young adult bulls. *Anim Reprod Sci* 13: 165-176.
- Taha MB, Noakes DE (1982) The effect of age and season of the year on testicular function in the dog, as determined by histological examination of the seminiferous tubules and the estimation of peripheral plasma testosterone concentrations. *J Small Anim Pract* 23: 351-357.
- Taha MB, Noakes DE, Allen WE (1981) The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Small Anim Pract* 2: 177-184.
- Thompson DL, Ewing LL, Lasley BL (1983) Oestrogen secretion by *in-vitro* perfused testes: species comparison and factors affecting short-term secretion. *J Endocrinol* 96: 97-105.
- Tsutsui T, Tsuji J, Kawakami E, Yamada Y, Amano T, Yamauchi M (1987) Peripheral plasma androgen levels in the male dog from birth to sexual maturity. *Jpn J Vet Sci* 49: 177-179.
- West CD, Hollander VD, Kritchevsky TH, Dobriner K (1952) The isolation and identification of testosterone, 4-androstenedione-3,17, and 7-ketocholesterol from spermatic vein blood. *J Clin Endocrinol Metab* 12: 915-916.
- Winter JSD, Faiman C, Reyes F (1981) Sexual endocrinology of fetal and perinatal life. In: Mechanisms of Sex Differentiation in Animals and Man (Austin CR, Edwards RG eds.), Academic Press, London. pp 205-253.
- Zanisi M, Messi E, Martini L (1987) *In vitro* release of luteinizing hormone-releasing hormone from the hypothalamus of old male rats. *Endocrinology* 120: 49-54.

要 約

雄ビーグル犬における血漿中 LH, テストステロン (T), およびエストラジオール-17 β (E₂) 濃度の動態について検討し, 以下の結果を得た。

1. 生後14日間においては, 雌雄の LH と T 値は雄成犬の値よりも有意 ($p<0.001$) に低値を示した。新生子期における雄の T 値は同時期の雌のそれに比べて有意 ($p<0.05$) に高値を示した。
2. 雄イヌの LH 値は年齢とともに増加し, 8 年以降13年までは一定の値を持続した。雄イヌの T 値は年齢とともに増加し, 1 年以降10年までは高値を持続した。その後, T 値は減少する傾向を示した。一方, 雄成犬の E₂ 値には加齢の影響は認められなかった。
3. 雄成犬の LH と T 値は年間を通して有意な変化を示さなかった。