

氏名（本籍）	佐藤美穂（福岡県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第105号
学位授与年月日	平成13年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	ニホンツキノワグマにおける妊娠の生殖内分泌学的研究
審査委員	主査 岐阜大学教授 工藤忠明 副査 帯広畜産大学教授 佐藤邦忠 副査 岩手大学教授 三宅陽一 副査 東京農工大学教授 加茂前秀夫 副査 岐阜大学教授 鈴木義孝

論文の内容の要旨

ニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus*) は、本州および四国に生息する大型哺乳類の一種で、季節繁殖性を示す。飼育下のニホンツキノワグマは、6月下旬から8月上旬に交尾期を迎え、その後受精した胚が、約4、5ヶ月間、胚盤胞の状態で発育を停止する着床遅延と呼ばれる過程を経て、11月下旬から12月上旬に着床し、着床から2ヶ月後の1月下旬から2月上旬に分娩する。本研究の目的は、ニホンツキノワグマにおける妊娠中の母体環境の内分泌調節機構を解明することであり、その中でも特にクマ類の着床遅延の生理メカニズム解明の一環として、着床とその前後を含めた内分泌学的変化に着目した。

本研究では、秋田県阿仁またぎの里熊牧場で飼育されている成熟雌グマ（総数52頭）を使用した。初めに1995年から1997年までに採取された血清96検体を使ってプロゲステロンおよびエストラジオール-17 β 濃度をラジオイムノアッセイにて測定し、妊娠に特徴的な性ステロイドホルモン濃度変化を調べた。次に1997年から2000年の間に、計23頭の雌グマについて定期的に血液採取を実施し、性ステロイドホルモン、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、プロラクチン (PRL) およびインヒビンの血中濃度を測定し、卵巢由来性ホルモンと下垂体由来性ホルモンの相互関係

を調べ、妊娠、分娩さらには哺乳といった雌の生殖活動を司る下垂体-性腺軸の内分泌調節機構の解明を試みた。さらに、着床遅延中の卵巣における性ステロイドホルモンおよびインヒビンの合成能を免疫組織化学的に調べ、これらのホルモンの血中レベルとの関係を検討した。

雌ニホンツキノワグマには、血中プロゲステロン濃度の変化より、妊娠、偽妊娠および非妊娠の3つの生殖生理学的状態が存在することが判明した。妊娠個体では、血中プロゲステロン濃度は、着床遅延期間（9月から11月）に徐々に上昇し、着床時（12月）に顕著に上昇した。その後1ヶ月後（1月）にピーク時の半値まで減少し、分娩翌日には基底レベルまで減少した。偽妊娠個体では、妊娠個体と類似したプロゲステロン濃度変化がみられ、妊娠していれば着床期に相当する時期（11月下旬から12月上旬）に顕著なプロゲステロン濃度の上昇が認められた。一方、非妊娠個体では、一部の個体で認められた1月の一過性の上昇を除くと、血中プロゲステロン濃度は一年間を通して基底レベルで維持された。妊娠個体および偽妊娠個体では、プロゲステロン濃度の変化に相関したPRL濃度の上昇が認められ、特に着床時期にあたる11月から12月にPRLの劇的な上昇がみられた。これらの所見より、11月から12月の血中プロゲステロンの上昇は、黄体の活性化に伴って起こり、その活性化をもたらす黄体刺激因子としてPRLが重要な作用をもたらしていることが示唆された。血中LH濃度は、プロゲステロン濃度と相関する変化はみられず、黄体機能の調節に関与するような所見は認められなかった。血中エストラジオール-17 β 濃度は、妊娠後半期（12月から1月）に上昇し、FSH濃度は12月に上昇したが、これらの傾向は妊娠、非妊娠に拘わらず認められた。一方、インヒビン濃度は、妊娠個体では個体によりその変化にばらつきがあり、一貫した傾向を捉えることができなかった。

妊娠後半期から授乳期の性ホルモン濃度変化を検討したところ、分娩が近づくにつれ血中プロゲステロン濃度は減少し、一方プロラクチン濃度は分娩後に上昇した。これらの所見より、ニホンツキノワグマも他の哺乳類と同様、分娩前のプロゲステロン濃度減少は、分娩の招来および泌乳において促進作用をもたらす重要な因子であり、また分娩後のプロラクチンの上昇は、新生子による吸入刺激によって起こり、これもまた泌乳に促進的に働くことが示唆された。

着床遅延中の卵巣のステロイド合成酵素およびインヒビン・サブユニットの局在を免疫組織化学的に調べたところ、プロゲステロンの合成に関わるP450sccおよび3 β HSDは全黄体細胞で、アンドロジェン合成に関わるP450c17は黄体辺縁の小型黄体細胞で、またエストロジェン合成に関わるP450aromは黄体実質の大型黄体細胞で検出された。さらにP450c17およびP450aromは、着床直前の黄体で増加する傾向にあった。一

方、インヒビン・サブユニットは、黄体と共存する中小卵胞の顆粒層細胞において検出され、また着床直前の黄体においても陽性反応はみられたが、顆粒層細胞の反応と比較すると微弱であった。以上のことより、着床前には黄体のホルモン合成能が高まっていること、また血中インヒビン濃度は、卵巣中の中小卵胞から分泌されるものを捉えていることが考えられた。

以上の結果をまとめると、PRLは黄体刺激作用および泌乳作用を有し、雌ニホンツキノワグマの生殖生理機能調節に重要な役割を果たしている。さらにPRLは、着床遅延中の黄体の活性化を引き起こし、着床を誘発する因子の第一候補に挙げられる。従って、PRLの黄体刺激因子としての役割は、妊娠維持および着床のタイミングひいては妊娠の長さの調節に決定的な役割を果たしていると推察される。

審 査 結 果 の 要 旨

ニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus*) は、本州および四国に生息する大型哺乳類の一種で、季節繁殖性を示す。飼育下のニホンツキノワグマは、6月下旬から8月上旬に交尾期を迎え、その後受精した胚が、約4、5ヶ月間、胚盤胞の状態では発育を停止する着床遅延と呼ばれる過程を経て、11月下旬から12月上旬に着床し、着床から2ヶ月後の1月下旬から2月上旬に分娩する。本研究の目的は、ニホンツキノワグマにおける妊娠中の母体環境の内分泌調節機構を解明することであり、その中でも特にクマ類の着床遅延の生理メカニズム解明の一環として、着床とその前後を含めた内分泌学的変化に着目した。

本研究では、秋田県阿仁またぎの里熊牧場で飼育されている成熟雌グマ（総数52頭）を使用した。初めに1995年から1997年までに採取された血清96検体を使ってプロゲステロンおよびエストラジオール- 17β 濃度をラジオイムノアッセイにて測定し、妊娠に特徴的な性ステロイドホルモン濃度変化を調べた。次に1997年から2000年の間に、計23頭の雌グマについて定期的に血液採取を実施し、性ステロイドホルモン、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、プロラクチン (PRL) およびインヒビンの血中濃度を測定し、卵巣由来性ホルモンと下垂体由来性ホルモンの相互関係を調べ、妊娠、分娩さらには哺乳といった雌の生殖活動を司る下垂体-性腺軸の内分泌調節機構の解明を試みた。さらに、着床遅延中の卵巣における性ステロイドホルモンおよびインヒビンの合成能を免疫組織化学的に調べ、これらのホルモンの血中レベルとの関係を検討した。

雌ニホンツキノワグマには、血中プロゲステロン濃度の変化より、妊娠、偽妊娠および非妊娠の3つの生殖生理学的状態が存在することが判明した。妊娠個体では、血中プロゲステロン濃度は、着床遅延期間（9月から11月）に徐々に上昇し、着床時（12月）に顕著に上昇した。その後1ヶ月後（1月）にピーク時の半値まで減少し、

分娩翌日には基底レベルまで減少した。偽妊娠個体では、妊娠個体と類似したプロジェステロン濃度変化がみられ、妊娠していれば着床期に相当する時期（11月下旬から12月上旬）に顕著なプロジェステロン濃度の上昇が認められた。一方、非妊娠個体では、一部の個体で認められた1月の一過性の上昇を除くと、血中プロジェステロン濃度は一年間を通して基底レベルで維持された。妊娠個体および偽妊娠個体では、プロジェステロン濃度の変化に相関したPRL濃度の上昇が認められ、特に着床時期にあたる11月から12月にPRLの劇的な上昇がみられた。これらの所見より、11月から12月の血中プロジェステロンの上昇は、黄体の活性化に伴って起こり、その活性化をもたらす黄体刺激因子としてPRLが重要な作用をもたらしていることが示唆された。血中LH濃度は、プロジェステロン濃度と相関する変化はみられず、黄体機能の調節に関与するような所見は認められなかった。血中エストラジオール-17 β 濃度は、妊娠後半期（12月から1月）に上昇し、FSH濃度は12月に上昇したが、これらの傾向は妊娠、非妊娠に拘わらず認められた。一方、インヒビン濃度は、妊娠個体では個体によりその変化にばらつきがあり、一貫した傾向を捉えることができなかった。

妊娠後半期から授乳期の性ホルモン濃度変化を検討したところ、分娩が近づくにつれ血中プロジェステロン濃度は減少し、一方プロラクチン濃度は分娩後に上昇した。これらの所見より、ニホンツキノワグマも他の哺乳類と同様、分娩前のプロジェステロン濃度減少は、分娩の招来および泌乳において促進作用をもたらす重要な因子であり、また分娩後のプロラクチンの上昇は、新生子による吸入刺激によって起こり、これもまた泌乳に促進的に働くことが示唆された。

着床遅延中の卵巢のステロイド合成酵素およびインヒビン・サブユニットの局在を免疫組織化学的に調べたところ、プロジェステロンの合成に関わるP450sccおよび3 β HSDは全黄体細胞で、アンドロジェン合成に関わるP450c17は黄体辺縁の小型黄体細胞で、またエストロジェン合成に関わるP450aromは黄体実質の大型黄体細胞で検出された。さらにP450c17およびP450aromは、着床直前の黄体で増加する傾向にあった。一方、インヒビン・サブユニットは、黄体と共存する中小卵胞の顆粒層細胞において検出され、また着床直前の黄体においても陽性反応はみられたが、顆粒層細胞の反応と比較すると微弱であった。以上のことより、着床前には黄体のホルモン合成能が高まっていること、また血中インヒビン濃度は、卵巢中の中小卵胞から分泌されるものを捉えていることが考えられた。

以上の結果をまとめると、PRLは黄体刺激作用および泌乳作用を有し、雌ニホンツキノワグマの生殖生理機能調節に重要な役割を果たしている。さらにPRLは、着床遅延中の黄体の活性化を引き起こし、着床を誘発する因子の第一候補に挙げられる。従って、PRLの黄体刺激因子としての役割は、妊娠維持および着床のタイミングひいては妊娠の長さの調節に決定的な役割を果たしていると推察される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Sato, M., Tsubota, T., Yamamoto, K., Komatsu, T., Hashimoto, Y., Katayama, A., Hazumi, T., Kita, I. and Kudo, T. (2000) Serum progesterone and estradiol-17 β concentrations in captive and free-ranging adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). The Journal of Veterinary Medical Science 62: 415-420
2. Sato, M., Nakano, N., Tsubota, T., Komatsu, T., MURASE, T., Kita, I. and Kudo, T. (2000) Changes in serum progesterone, estradiol-17 β , luteinizing hormone and prolactin in lactating and non-lactating Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). The Journal of Reproduction and Development. 46: 301-308

既発表学術論文

1. Tottori, J., Yamaguchi, R., Murakawa, Y., Sato, M., Uchida, K. and Takeyama, S. (1997) Experimental production of ascites in broiler chickens using infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. Avian Diseases. 41: 214-220
2. Tottori, J., Yamaguchi, R., Murakawa, Y., Sato, M., Uchida, K. and Takeyama, S. (1997) The use of feed restriction for mortality control of chickens in broiler farms. Avian Diseases 41: 433- 437