

氏名(本(国)籍)	山本 ゆ き (静岡県)		
主指導教員名	東京農工大学 教授 田谷 一 善		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第344号		
学位授与年月日	平成23年9月22日		
学位授与の要件	学位規則第3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	東京農工大学		
学位論文題目	雌ゾウの生殖機能調節におけるプロラクチンの生理的役割に関する研究		
審査委員	主査	東京農工大学 教授	加茂前 秀 夫
	副査	帯広畜産大学 教授	北 村 延 夫
	副査	岩手大学 教授	橋 爪 一 善
	副査	東京農工大学 教授	田 谷 一 善
	副査	岐阜大学 教授	柳 井 徳 磨

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究では、ゾウの生殖生理学の解明を目的として、生殖内分泌学的解析を行った。

第1章では、緒論としてゾウの生殖内分泌学について概説し、研究の目的を述べた。

第2章では、本研究に共通する実験材料と方法について記述した。

第3章では、ゾウのプロラクチン(PRL)濃度測定法の開発と発情周期中PRL分泌について記述した。最初に、アフリカゾウとアジアゾウのPRL測定が可能なラジオイムノアッセイ法(RIA)を開発した。このRIAを用いて以下の新知見を明らかにした。アフリカゾウ1頭(4周期)において、血中PRL濃度は、卵胞期に高く黄体期に低いパターンを示した。アジアゾウ1頭(7周期)において、血中PRL濃度が卵胞期に低く、黄体期に高い明瞭な周期性が認められた。以上の結果から、アフリカゾウとアジアゾウでは、発情周期中のPRL分泌パターンは異なるが、明瞭な周期性を示すことから卵巢機能が関連していると推察された。

第4章では、卵巢機能とPRL分泌について記述した。飼育下の雌ゾウは、繁殖可能な年齢でも排卵が停止した個体が多い。排卵が停止したアフリカゾウ3頭とアジアゾウ1頭の血中PRL濃度は、周期性は認められなかった。アフリカゾウのうちの1頭は、乳房が著しく発達して、血中PRL濃度が高値を示したことから高PRL血症と診断した。1頭のアジアゾウの排卵が停止する前後における血中PRLとコルチゾール濃度が、有意な高値を示した。この雌アジアゾウは同居させた雄ゾウから攻撃を受けており、ストレスが、排卵停止の原因と推察さ

れた。

第5章では、妊娠期における PRL 分泌について記述した。1頭の雌アフリカゾウと、1頭の雌アジアゾウの全妊娠期間の血中 PRL 濃度を測定した結果、いずれの個体でも血中 PRL 濃度は、妊娠期に二峰性の明瞭な分泌パターンを示した。血中 PRL 濃度は、妊娠約6ヶ月から急激に上昇し、妊娠8-12ヶ月に第一次ピーク、妊娠19-21ヶ月に第二次ピークを示し、分娩後は急激に低下した。また、アフリカゾウの妊娠17ヶ月での流産例では、第二次ピークは認められず、流産の起こる約16週間前から血中 PRL 濃度は低値を示した。流産胎子は体重が著しく軽かった。これらの結果から、妊娠期間中には PRL が妊娠維持や胎子の成長に関連していることが推察された。

第6章では、泌乳期の内分泌的变化について記述した。2頭のアフリカゾウと1頭のアジアゾウの、分娩直前から発情周期の再開までの期間における血中各種ホルモン濃度を測定した結果、死産・流産や子ゾウを親から分離して飼育し、母体が吸乳刺激を受けなかった事例では、分娩後無排卵の長さはおおよそ2-3ヶ月であった。一方、母ゾウが子ゾウに授乳した場合や飼育担当者による母ゾウから搾乳した場合には、卵巢機能の回復が遅延した。無排卵期中の血中 PRL およびコルチゾール濃度は、吸乳刺激または搾乳が行われた場合に有意な高値を示した。以上の結果から、分娩後のゾウにおいて、吸乳刺激が直接的に生殖機能を抑制していることが明らかとなった。

第7章では、胎盤における PRL 様物質の分泌について記述した。胎盤ホモジネート中の PRL を測定した結果、胎盤中には多量の PRL 様物質が存在することが判明した。ウェスタンブロットティングにより PRL 様物質の分子量を解析した結果、他のほ乳類の PRL 分子量とほぼ同一の、23-24kDa の位置に明瞭なバンドを検出した。アジアゾウの満期胎盤とアフリカゾウの妊娠初期から満期までの胎盤を用いて、PRL 様物質の局在性を免疫組織化学染色により解析した結果、妊娠期間を通して、栄養膜細胞に PRL 様物質の局在が認められた。以上の結果から、胎盤はゾウの妊娠期における PRL 様物質の分泌源であろうと推察された。

第8章では、発情周期と妊娠期における卵巢の内分泌機能について記述した。ゾウは、単排卵動物であるが卵巢には複数の副黄体が形成される。この副黄体は妊娠全期間を通して維持されることが知られているが、内分泌機能は不明である。抗ヒト PRL 抗体を用いて、2頭のアフリカゾウおよび2頭のアジアゾウから採取された卵巢の免疫組織化学染色を行った結果、卵胞顆粒層細胞と黄体細胞に陽性反応が認められ、卵胞顆粒層細胞と黄体細胞からは、PRL が分泌されている可能性が示唆された。アフリカゾウとアジアゾウの発情周期中には、インヒビン濃度はプロジェステロン濃度と平行して黄体期に上昇し、黄体がインヒビンとプロジェステロンの主要分泌源であることが明らかとなった。一方、妊娠期には、プロジェステロン濃度は全妊娠期間を通して高値を示すがインヒビンは妊娠初期のみ高値を示し、その後は分娩まで低値を維持することが判明し、発情周期黄体が妊娠黄体に移行するに伴って、内分泌機能が変化し、妊娠維持作用を発揮するものと推察された。

以上の研究から、ゾウでは、胎盤が PRL または PRL 様物質の主要な分泌源であることが初めて明らかとなった。本研究結果を総合して、「ゾウでは、胎盤から分泌される PRL 様物質に

より副黄体と妊娠黄体が刺激されプロジェステロンを分泌することにより、22カ月に亘る妊娠期間を維持する」との仮説を提唱するに至った。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ゾウは、他の哺乳類とは異なる生殖生理学特徴を有し、未解明な部分が多い。本研究では、雌ゾウの生殖機能調節におけるプロラクチン(PRL)の生理的役割を解明することを目的とした。

### I 非妊娠期の卵巣機能と PRL 分泌

最初に、アフリカゾウとアジアゾウの PRL 測定が可能なラジオイムノアッセイ法 (RIA) を開発した。

発情周期を回帰するアフリカゾウ (1頭, 4周期) において、血中 PRL 濃度は、卵胞期に高く黄体期に低い分泌パターンを示した。一方、アジアゾウ (1頭, 7周期) では、血中 PRL 濃度は卵胞期に低く黄体期に高い明瞭な周期性を示した。また、排卵が停止したアフリカゾウ (3頭) とアジアゾウ (1頭) では、血中 PRL 濃度の周期的な変化は認められなかった。以上の結果から、アフリカゾウとアジアゾウでは、発情周期による PRL の分泌パターンは一致しないが、それぞれが明瞭な周期性を示すことから、PRL 分泌は卵巣機能と関連することが推察された。

雌アフリカゾウのうちの1頭は、長期間に亘って乳房が著しく発達し、血中 PRL 濃度は高値を示したことから、高 PRL 血症と診断した。また、1頭のアジアゾウが排卵の停止する過程での血中 PRL とコルチゾール濃度を測定した結果、排卵停止後の値が排卵停止前よりも有意な高値を示したことから、ストレスが原因となって排卵が停止したものと推察された。

### II 妊娠期における PRL 分泌と胎盤における PRL 様物質の分泌

アフリカゾウとアジアゾウ共に血中 PRL 濃度は、妊娠期に著しい高値を示し、二峰性の明瞭な分泌パターンを示した。血中 PRL 濃度は、妊娠約6ヶ月から急激に上昇し、妊娠8-12ヶ月に第1次ピーク、妊娠19-21ヶ月に第2次ピークを示して分娩後に急激に低下した。妊娠17ヶ月で流産した例では、第2次ピークは認められず、血中 PRL 濃度は流産の起こった約16週間前から低値を維持した。流産胎子は、体重が著しく低値であった。これらの結果から、妊娠期間中には PRL が妊娠維持や胎子の成長に関連しているものと推察された。

ゾウ胎盤ホモジネート中の PRL を測定した結果、胎盤中には多量の PRL 様物質が存在することが明らかとなった。ウェスタンブロッティングにより PRL 様物質の分子量を解析した結果、他の哺乳類の PRL 分子量とほぼ同一の 23-24kDa の位置に明瞭なバンドを検出した。アジアゾウの満期胎盤とアフリカゾウの妊娠初期から満期までの胎盤を用いて、PRL 様物質の局在性を免疫組織化学染色により解析した結果、妊娠期間を通して、栄養膜細胞に PRL 様物質の局在が認められた。以上の結果から、胎盤は、ゾウの妊娠期における PRL 様物質の分泌源であると推察された。

### Ⅲ 発情周期黄体と妊娠黄体の内分泌機能

ゾウは、単排卵動物であるが卵巣には複数の副黄体が形成される。副黄体は妊娠期には良く発達し、妊娠全期間を通して維持されることが知られているが、内分泌機能は不明である。

アフリカゾウとアジアゾウの血中インヒビン (INH) 濃度はプロジェステロン ( $P_4$ ) と平行して黄体期に上昇することから、黄体がINHと $P_4$ の主要分泌源であることが明らかとなった。一方、妊娠中には、 $P_4$ は全妊娠期間を通して高値を示すがINHは妊娠初期のみ高値を示した。以上の結果から、発情周期黄体が妊娠黄体に移行するに伴って、内分泌機能が変化して妊娠維持作用を発揮するものと推察された。

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があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Prolactin secretion and ovarian function in cycling and non-cling African female elephants (*Loxodonta africana*)  
著 者 名: Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Watanabe, G., Yuto, N., Keio, M., Narushima, E., Katayanagi, M., Nakao, R., Morikubo, S., Sakurai, Y., Kaneko, M., Kaewmanee S. and Taya K.  
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年: 72 (7): 845-852, 2010
- 2) 題 目: Placentation in the African elephant (*Loxodonta africana*): V. The trophoblast secretes placental lactogen  
著 者 名: Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Taya, K., Watanabe, G., Stansfield, F. and Allen, T.  
学術雑誌名: Placenta  
巻・号・頁・発行年: 32 (7): 506-510, 2011
- 3) 題 目: Secretory pattern of inhibin during estrous cycle and pregnancy in African (*Loxodonta africana*) and Asian (*Elephas maximus*) elephants  
著 者 名: Yamamoto, Y., Yuto, N., Yamamoto, T., Kaewmanee, S., Shiina, O., Mouri, Y., Narushima, E., Katayanagi, M., Sugimura, K., Nagaoka, K., Watanabe, G. and Taya, K.  
学術雑誌名: Zoo Biology  
巻・号・頁・発行年: In press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目: Secretion of inhibin during the estrous cycle in the female Asian elephant (*Elephas maximus*)  
著 者 名: Kaewmanee, S., Watanabe, G., Kishimoto, M., Jin, W.Z., Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Nagaoka, K., Narushima, E., Komiya, T. and Taya, K.  
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年: 73(1), 77-82, 2011

- 2) 題 目: A surge-like increase in luteinizing hormone preceding musth in a captive bull African elephant (*Loxodonta africana*)  
著 者 名: Kaewmanee, S., Watanabe, G., Keio, M., Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Kishimoto, M., Nagaoka, K., Narushima, E., Katayanagi, M., Nakao, R., Sakurai, Y., Morikubo, S., Kaneko, M., Yoshihara, M., Yabe, T. and Taya, K.  
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年: 73(3), 379-383, 2011
- 3) 題 目: Unique role of the double LH peak for dominant follicle selection in Asian elephants (*Elephas maximus*)  
著 者 名: Lueders, I., Taya, K., Watanabe, G., Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Kaewmanee, S., Niemuller, C., Gray, C., Jürgen W. S. and Hiodebrandt, T. B.  
学術雑誌名: The Biology of Reproduction  
卷・号・頁・発行年: In press