



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Interactions of Gonadotropins and Ovarian Hormones on Steroidogenesis in Ovarian Follicles of the Hen( 内容の要旨 )
Author(s)	Caicedo Ricardo, Enrique
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第086号
Issue Date	1997-03-14
Type	博士論文
Version	
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2427">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2427</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏 名 (国籍)	Caicedo Ricardo Enrique (パナマ共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第86号
学位授与年月日	平成9年3月14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	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Interactions of Gonadotropins and Ovarian Hormones on Steroidogenesis in Ovarian Follicles of the Hen
審査委員	主査 岐阜大学教授 上吉道治 副査 岐阜大学教授 川島光夫 副査 信州大学教授 太田克明 副査 静岡大学教授 森 誠

### 論文の内容の要旨

鳥類においては、卵巣の卵胞において生産される主なステロイドホルモンはプロジェステロン(P4)、テストステロン(T)とエストラジオール-17 $\beta$ (E2)である。これらのホルモンの中で、P4は視床下部-下垂体-卵巣軸の内分泌支配において重要な役割を果たしていることは良く知られている。P4は大きい卵胞の顆粒層細胞で生産され、一方TとE2は比較的小さい卵胞の卵胞膜の内層細胞と外層細胞においてそれぞれ生産されている。顆粒層細胞におけるP4生産は主にLHによって支配されているが、内層細胞と外層細胞におけるステロイドホルモン生産に対する性腺刺激ホルモンの役割は未だ十分には理解されていない。また、最近 *in vitro* の実験において、P4とTがニワトリの顆粒層細胞におけるP4生産に影響を与えると報告されているが、P4とTが顆粒層細胞におけるP4生産に与える影響は未だ十分には明らかにされていない。

従って、本研究は、ニワトリの卵巣卵胞におけるステロイドホルモン生産に対する性腺刺激ホルモンと卵巣ステロイドホルモンの相互作用を明確にすることを目的として、3つの実験を行った。

最初の実験は、ニワトリの排卵周期中におけるステロイドホルモンの分泌とLH放出との関係を明確にすることを目的とした。その結果、排卵周期中における血中LH濃度は排卵6-5時間前に顕著な増加を示すまでは有意な変化は認められなかった。血中P4濃度と最大卵胞(F1)のP4含量は排卵前のLHの増加に先立ち排卵8-7前に有意な増加が認められた。一方、血中TとE2濃度の変動の様相は血中LH濃度の変動の様相とほぼ同じであったが、卵胞膜のTとE2含量は2番目に大きい卵胞(F2)ではF1の排卵6-3時間前以外にF1の排卵18-15時間前においてもピークが認められ、また、F1の卵胞膜のTとE2含量に関してもF1の排卵直前にはピークは認められなかったが排卵18-17時間前には小さなピークが認められた。さらに、顆粒層細胞における *in vitro* 実験において、LH作用によりP4生産はF1とF2の両方においてF1の排卵16-15時間前から8-7時間前にかけて徐々に増加することが見出された。これらのことから、F1の排卵18-15時間前に相当する時期に卵胞膜においてTとE2の生産が増加していると推察され、卵胞膜細胞で生産されるステロイドホルモンが *in vivo* においても顆粒層細胞におけるP4生産に影響を与えている可能性が示唆された。

次の実験では、性腺刺激ホルモンであるLHと卵胞刺激ホルモン(FSH)の作用によるステロイドホルモンの生産を成熟状態の異なる卵胞の顆粒層細胞、卵胞膜内層細胞と外層細胞において比較検討した。その結果、LHの作用により大きい卵胞の顆粒層細胞において多量のP4生産が認められたこと、

卵胞膜ではTと少量のP4が内層細胞の培養液では認められたが外層細胞では認められなかったこと、さらにE2は外層細胞では検出されたが内層細胞では検出されなかったことから、鳥類ではP4, TとE2はそれぞれ顆粒層細胞、卵胞膜内層細胞と外層細胞で生産されるという鳥類の卵胞におけるステロイドホルモン生産に関する3細胞説が確認された。さらに、内層細胞のP4とTの生産はLHとFSHの作用により増加したがそれらの性腺刺激ホルモンによる効果は大きい卵胞に比べ小さい卵胞の方が大きいこと、また外層細胞におけるE2生産はFSHのみにより刺激されがその刺激の程度は小さい卵胞の方が大きい卵胞に比べて大きかったことから、卵胞膜細胞では性腺刺激ホルモンの作用によるステロイドホルモン生産は小さい卵胞の方が多いことを明らかにした。

最後の実験では、顆粒層細胞のP4生産に対するTとE2の影響と卵胞膜内層細胞に対するE2の影響をニワトリにおいて検討した。その結果、顆粒層細胞の4時間の短期培養においては、P4生産はLHによつては増加が認められたがTとE2による影響は認められなかった。しかしながら、48時間無血清培養液で単層培養された顆粒層細胞に、その後48時間、LH、TまたはE2を作用させると、用量に依存して、LH以外にTがP4生産を刺激することが見出され、しかもLHによる刺激効果は作用後6時間に最も高く、一方Tの刺激効果は作用12時間後から認められ36時間後において最も高いこと、さらに、LHによるP4生産がE2の前処理により影響を受けるか否かを検討したところ、用量に依存して、しかも12時間以上のE2前処理によつて、LHによるP4生産が増加したことから、ニワトリの顆粒層細胞において、Tが長期作用によりP4生産を刺激し、また予め長期間E2で前処理することによりE2がLHによるP4生産に対する反応性を高めることを明らかとなった。また、4時間の短期培養によりE2の添加により卵胞膜内層細胞におけるP4とT生産が増加し、しかもより小さい卵胞の方がそれらの効果が大きいことが見出された。

以上の結果は、ニワトリにおいて、顆粒層細胞におけるP4生産が性腺刺激ホルモン以外に性腺刺激ホルモンの作用によつて卵胞膜細胞で生産されるTとE2の長期作用によつて刺激されることを明らかにし、卵巣卵胞におけるステロイドホルモン生産に対する性腺刺激ホルモンと卵巣ステロイドホルモンの相互作用を明確にした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

家禽においては、卵巣の卵胞において生産される主なステロイドホルモンはプロジェステロン(P4)、テストステロン(T)とエストラジオール-17 $\beta$ (E2)である。それらのステロイドホルモンの中で、P4は視床下部-下垂体-卵巣軸の内分泌支配において重要な役割を果たしていることは良く知られている。P4は大きい卵胞の顆粒層細胞で生産され、一方、TとE2は比較的小さい卵胞の卵胞膜の内層細胞と外層細胞においてそれぞれ生産されている。顆粒層細胞におけるP4生産は主にLHによつて支配されているが、内層細胞と外層細胞におけるステロイドホルモン生産に対する性腺刺激ホルモンの役割は未だ十分には理解されていない。また、最近 *in vitro* の実験において、P4とTがニワトリの顆粒層細胞におけるP4生産に影響を与えると報告された。しかしながら、P4とTが顆粒層細胞におけるP4生産に与える影響は未だ十分には明らかにされていない。

本研究は、かかる背景のもとに、ニワトリの卵巣卵胞におけるステロイドホルモン生産に対する性腺刺激ホルモンと卵巣ステロイドホルモンの相互作用を明確にすることを目的として行われ、論文は内容より3つ実験に大別できる。以下にその概略を述べる。

最初の実験は、ニワトリの排卵周期中におけるステロイドホルモンの分泌とLH放出との関係を明確にすることを目的として行われている。その結果、排卵周期中における血中LH濃度は排卵6-5時間前に顕著な増加を示すまでは有意な変化は認められていない。しかし、血中P4濃度と最大卵胞(F1)のP4含量は排卵前のLHの増加に先立ち排卵8-7前に有意な増加が認められた。一方、排卵周期中における血中TとE2濃度の変動の様相は血中LH濃度の変動の様相とほぼ同じであったが、卵胞膜のTとE2含量は2番目に大きい卵胞(F2)ではF1の排卵6-3時間前以外にF1の排卵18-15時間前においてもピークが認められ、また、F1の卵胞膜のTとE2含量に関してもF1の排卵直前にはピークは認められなかったが排卵18-17時間前には小さなピークが認められたことから、F1の排卵18-15時間前に相当する時期に卵胞膜でTとE2の生産が増加していると推察している。さらに、顆粒層細胞における *in vitro* 実験において、LH作用によりP4生産は

F1とF2の両方においてF1の排卵16-15時間前から8-7時間前にかけて徐々に増加することを見出している。これらの結果から、*in vivo*においても顆粒層細胞におけるP4生産が卵胞膜細胞で生産されるステロイドホルモンにより影響されていると推察している。

2番目の実験では、性腺刺激ホルモンであるLHと卵胞刺激ホルモン(FSH)の作用によるステロイドホルモンの生産を成熟状態の異なる卵胞の顆粒層細胞、卵胞膜内層細胞と外層細胞において比較検討している。その結果、LHの作用により大きい卵胞の顆粒層細胞において多量のP4生産が認められたこと、卵胞膜ではTと少量のP4が内層細胞の培養液では認められたが外層細胞では認められなかったこと、さらにE2は外層細胞では検出されたが内層細胞では検出されなかったことから、鳥類ではP4、TとE2はそれぞれ顆粒層細胞、卵胞膜内層細胞と外層細胞で生産されるという鳥類の卵胞におけるステロイドホルモン生産に関する3細胞説を支持している。さらに、内層細胞のP4とTの生産はLHとFSHにより増加したがそれらの性腺刺激ホルモンによる効果は大きい卵胞に比べ小さい卵胞の方が大きく、その増加の割合はLHの場合の方がFSHの場合に比べて多いこと、外層細胞におけるE2生産はFSHのみにより刺激され、しかもその程度は小さい卵胞の方が大きい卵胞に比べて大きかったことから、卵胞膜細胞では性腺刺激ホルモンの作用によるステロイドホルモン生産は小さい卵胞の方が多いいことを明らかにした。これらの結果は、"Steroidogenesis in Theca Cells of Chicken Follicles in Response to Ovine Gonadotropins"としてまとめ、*Japanese Poultry Science* 34:36-44, 1997に記載されている。

3番目の実験は、顆粒層細胞のP4生産に対するTとE2の影響と卵胞膜内層細胞に対するE2の影響をニワトリにおいて検討している。その結果、顆粒層細胞の4時間の短期培養においては、P4生産はLHによっては増加が認められたがTとE2による影響は認められていない。しかしながら、48時間無血清培養液で単層培養された顆粒層細胞に、その後48時間、LH、TまたはE2を作用させると、用量に依存して、LH以外にTがP4生産を刺激することが見出され、しかもLHによる刺激効果は作用後6時間に最も高く、一方Tの刺激効果は作用12時間後から認められ36時間後において最も高いこと、さらに、LHによるP4生産がE2の前処理により影響を受けるか否かを検討したところ、用量に依存して、しかも12時間以上のE2前処理によって、LHによるP4生産が向上したことから、ニワトリの顆粒層細胞において、Tが長期作用によりP4生産を刺激し、また予め長期間E2で前処理することによりE2がLHによるP4生産に対する反応性を高めることを明らかにしている。また、4時間の短期培養によりE2の添加により卵胞膜内層細胞におけるP4とT生産が増加し、しかもより小さい卵胞の方がそれらの効果が大きいことを見出している。これらの結果の一部は、"Effects of Testosterone and Estradiol-17 $\beta$  on Progesterone Production by Granulosa cells of the hen"としてまとめて、*Japanese Poultry Science*, 1997で印刷中である。

以上述べてきたように、本研究は、ニワトリにおいて、顆粒層細胞におけるP4生産が、性腺刺激ホルモン以外に性腺刺激ホルモンの作用により卵胞膜細胞で生産されるTとE2の長期作用によって刺激されることを明らかにし、家禽生理学に寄与することが大である。

よって、審査員一同は、本論文を岐阜大学大学院連合農学研究科における博士(農学)の学位論文に値するものと認めた。