

学 位 論 文 題 名

放射免疫測定のためのウシ血漿中エストロゲンの固相抽出法に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究は、固相抽出法を利用してウシの末梢血中エストロゲンを効率よく抽出、分画することを目的として行った。エストロゲンの簡便で確実な抽出精製法が開発され、測定が容易になれば、ウシの生殖機能研究への貢献が期待できる。

まず、固相抽出でのステロイドの溶出パターンを推定するため、雌ウシの生殖機能において重要な6種類のステロイドについて、高速液体クロマトグラフィーによる精密な分離パターンの検討を行った。その結果、一般的に用いられている簡易逆相カートリッジ(C₁₈:セブパック)でもエストロゲンとプロゲステロンおよびエストロンサルフェートとその他のエストロゲンを分離して回収できる可能性が示された。

次に、ウシの血漿に添加した活性型および抱合型のエストロゲンが、固相抽出法により抽出・精製できるかどうか検討した。まず、血漿の量を変えて固相のエストロゲンに対する保持能を調べ、次いで、メタノールの段階的濃度勾配による溶出を試みた。さらに、活性型と抱合型のエストロゲンを分離して回収できるかどうか検討した。その結果、いずれのエストロゲンも、生殖周期の時期や血漿の量に関わらず、逆相カートリッジに高率かつ定量的に保持された。濃度勾配による溶出パターンは高速液体クロマトグラフィーでの結果と良く一致しており、エストロンサルフェートは40%メタノールに、エストロンとエストラジオール-17βは70%メタノール画分に溶出した。これらのことから、固相抽出法によりウシ血漿中のエストロゲンを定量的に抽出できることが確認された。また、逆相カートリッジに保持された活性型および抱合型エストロゲンを分離して回収できることが示唆された。

続いて、ウシの血液試料から内因性のエストロゲンを固相抽出し、放射免疫測定法で定量的に濃度を測定できるかどうか検討した。まず、用いた血漿の量によって

測定値に影響があるかどうか調べ、測定に相応しい血漿量を決定した。次いで、エストロゲンの測定に影響を及ぼす夾雑物の特性について検討を行うと共に、血液成分が内因性エストロゲンの抽出に及ぼす影響についても検討した。加えて、測定値の信頼性を確かめるため、ウシの血漿に外因性のエストロゲンを添加し、固相抽出および放射免疫測定法による回収試験を行った。さらに、抽出法が確立されているエストラジオール- 17β について、既存の方法と固相抽出法により同一試料からの抽出を行い、放射免疫測定法によって測定された濃度の比較を行った。その結果、内因性のエストロゲンも簡易逆相カートリッジに定量的に保持され、40%と75%のメタノールで段階的に溶出させることにより活性型と抱合型のエストロゲンを分離して回収できることが分かった。放射免疫測定法による測定値は用いた血漿の量に依存して低下したが、血漿量が2 ml以下であれば、所定の濃度のメタノールで溶出させた固相抽出物を直接測定に供する事により、ウシ血漿中に含まれる活性型、抱合型双方のエストロゲンを定量的に測定できることが分かった。一方、エストロゲン濃度が低く、2 mlを越える血漿を用いる必要がある場合は、既知量のエストロゲンを含む血漿の回収率で測定値を補正することにより、正確な濃度を算出できることが示唆された。また、活性型のエストロゲンでは、固相抽出物をさらに液-液抽出する2段階抽出法を行うことにより、血漿の量が増えても定量的に濃度を測定できることが示された。

さらに、固相抽出法と特異性の高い測定法を利用することにより、正常発情周期および体外受精胚移植による単胎および双胎妊娠牛の妊娠初期における末梢血中のエストロンサルフェート濃度の推移を明らかにした。ウシの発情周期における末梢血中エストロンサルフェート濃度は、活性型のエストロゲン濃度との間に有意な相関を示したものの、エストラジオール- 17β と比較して変動範囲が狭く、卵胞発育の指標としては相応しくないことが分かった。また、妊娠牛では、妊娠45日まではいずれのエストロゲンでも妊娠に伴う濃度の変化を認めなかったが、45日を過ぎると、妊娠の経過に伴ってエストロンサルフェート濃度が上昇した。一方、活性型のエストロゲンは、妊娠59日まで低値で推移した。エストロンサルフェート濃度が上昇し始めた時期は、双胎の方が単胎より早くなる傾向が認められ、また、濃度の上昇率も双胎の方が単胎より大きかった。妊娠期のエストロンサルフェートの産生は胎盤の発達に依存しており、本実験の結果から、末梢血中のエストロンサルフェー

ト値が胎盤形成の指標として利用価値の高いことが示唆された。

以上、本研究によってウシの血液中エストロゲンの効率的な固相抽出法を確立することができた。さらに、本法により発情周期および妊娠初期におけるウシの末梢血中エストロンサルフェートの動態を明らかにすることができた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	金川弘司
副査	教授	斉藤昌之
副査	教授	桑原幹典
副査	助教授	高橋芳幸

学位論文題名

放射免疫測定のためのウシ血漿中エストロゲン の固相抽出法に関する研究

申請者は、簡易逆相カートリッジを用いてウシ末梢血中のエストロゲンを効率よく抽出および分画できる固相抽出法の確立を図るとともに、確立した固相抽出法を利用して正常発情周期および妊娠初期のウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移を検討した。

まず、固相抽出におけるステロイドの溶出パターンを推定するため、高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。ついで、血漿に添加した活性型および抱合型エストロゲンが固相抽出法により抽出・精製できるかどうか検討した。さらに、内因性のエストロゲンを固相抽出し、放射免疫測定法により定量的に測定できるかどうか検討した。その結果、いずれのエストロゲンも生殖周期の時期や血漿の量にかかわらず固相に良く保持され、メタノールの段階的濃度勾配により活性型と抱合型のエストロゲンを分離して回収できることが分かった。また、注入する血漿量を2ml以下にするか、固相抽出物をさらに液-液抽出することにより、活性型および抱合型双方のエストロゲンを定量的に測定できることを明らかにした。さらに、確立した固相抽出法を利用して正常発情周期のウシ末梢血中エストロンサルフェート濃度の推移を明らかにするとともに、妊娠初期のエストロンサルフェート濃度は活性型のエストロゲンに先駆けて上昇することから胎盤形成の指標として利用可能なことを示した。

以上のように、申請者はウシ末梢血中エストロゲンの効率的な固相抽出を確立し、その方法を用いて正常発情周期および妊娠初期のウシ末梢血中エストロンサルフェート濃度の推移を明らかにした。よって、審査員一同は申請者が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。