

日長によるヤギの成長ホルモン (GH) とプロラクチン (PRL) 分泌修飾に関する研究

2014 年

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物生産科学専攻  
(岩手大学)

金 金

第1章 緒論 .....	6
第2章 日長が雌ヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響	
第1節 明期 (昼間) における GH と PRL 分泌パターン	
1. 緒言 .....	13
2. 材料及び方法 .....	14
3. 結果 .....	18
4. 考察 .....	27
5. 要約 .....	29
第2節 暗期 (夜間) における GH と PRL 分泌パターン	
1. 緒言 .....	31
2. 材料及び方法 .....	32
3. 結果 .....	34
4. 考察 .....	41
5. 要約 .....	43
第3節 メラトニン (MEL) 処理における GH と PRL 分泌パターン	
1. 緒言 .....	45
2. 材料及び方法 .....	46
3. 結果 .....	49
4. 考察 .....	59
5. 要約 .....	61
第3章 日長が雄ヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響	
1. 緒言 .....	63
2. 材料及び方法 .....	64

3. 結果	68
4. 考察	82
5. 要約	85
第4章 視床下部内ドーパミン (DA) がヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響	
1. 緒言	87
2. 材料及び方法	89
3. 結果	91
4. 考察	99
5. 要約	102
第5章 総括	103
謝辞	108
引用文献	109
英文摘要	122

本論文における略語

AADC	芳香族アミノ酸脱炭酸酵素
AC	アデニル酸シクラーゼ
AUC	ホルモンの放出面積
BBB	血液脳関門
b.w.	体 重
Carbi	カルビドーパ
CTL	対照区
DA	ドーパミン
D1	ドーパミン第1受容体
D2	ドーパミン第2受容体
cAMP	サイクリック AMP
EIA	エンザイムイムノアッセイ
GH	成長ホルモン
GHRH	成長ホルモン放出ホルモン
GHRP-2	成長ホルモン放出ペプチド-2
GHS	成長ホルモン分泌促進因子
IGF-1	インスリン様成長因子-1
i.v.	静脈内投与
L-dopa	L-ドーパ (レボドーパ)
mean $\pm$ SEM	平均値 $\pm$ 標準誤差
MEL	メラトニン
OX	オキシトシン

PLC	ホスホリパーゼ C
PRL	プロラクチン
RIA	ラジオイムノアッセイ
SAL	サルソリノール
SS	ソマトスタチン
T	テストステロン
TRH	甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン
VIP	血管作動性腸ペプチド
8:16 L:D (8L)	8 時間明期 : 16 時間暗期
16:8 L:D (16L)	16 時間明期 : 8 時間暗期

## 第 1 章

### 緒 論

成長ホルモン (GH) は下垂体前葉の GH 分泌細胞 (ソマトトロフ) から分泌される蛋白質ホルモンである。GH の分泌は視床下部から放出される成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) とソマトスタチン (SS) によりそれぞれ促進的及び抑制的に制御されている [18,28,38,69,112]。しかし、GH の分泌制御機構は複雑で、GHRH や SS のほか、視床下部に存在する神経ペプチドや胃から分泌される GH 分泌促進因子グレリンも GH 分泌の制御機構に係っていることが知られている [64,97,113]。さらに GH の分泌は GH 自身によるネガティブフィードバックによっても調整されていることが知られている。反芻家畜の GH はヒトと同様に、191 個のアミノ酸残基からなり、分子量は約 22,000 である。GH の血中における半減期は 20-25 分間である [105]。GH は蛋白質、核酸の合成を促進するが、炭水化物や脂質の代謝にも関与する [14,112]。また、GH は乳腺発育及び泌乳の維持に重要な機能を持ち、家畜においては成長のみならず泌乳にも密接に関係している [31]。さらに GH は生殖領域では卵胞や黄体の発育にも関与している。GH が分泌すると肝臓でインスリン様成長因子-1 (IGF-1) が産生される。IGF-1 は筋肉の成長や脂質の代謝促進、骨端軟骨の細胞増殖を促す [112]。IGF-1 も下垂体に作用してネガティブフィードバック機構により GH の分泌を抑制する [39,112,131]。

GH分泌に関係するGHRHとSSは主として視床下部の弓状核と室周囲核にそれぞれ神経細胞体を持つGHRHニューロンとSSニューロンにより産生される [28,69,112]。GHRHニューロンは正中隆起に投射されており、下垂体門脈に放出されたGHRHは、下垂体門脈を介して下垂体まで運搬される。GHRHが下垂体前葉のGH分泌細胞にある受容体に結合すると、細胞内のアデニル酸シクラーゼ (AC) が活性化され、サイクリックAMP (cAMP) を増加させてGHの合成と放出が刺激される [6,28,38,85,112]。視床下部の室周囲核に存在するSSニューロンもその神経終末を正中隆起に終末し、下垂体門脈血中にSSを放出する。下垂体まで運搬されたSSは、下垂体前葉のGH細胞膜上に存在するSS受容体と結合する。SSが受容体と結合すると細胞内のACの活性が抑制され、cAMPの産生が減少し、GHの分泌が抑制される [10,28,112]。ラット [6,33]、マウ

ス [79] 及びヒト [40] におけるin vitro実験から、SSはGHの放出を抑制するが、GH合成には影響しないことが示唆されている。またSSはGHの放出を抑制するだけでなく、GHRHの放出やGHRHで誘起されるGH分泌も抑制する [10]。

GHはパルス状に放出されることが知られており、GHパルスの振幅と頻度はGHの生理活性発現に重要であると考えられている [45]。GHがパルス状分泌を示すことはヒト [32,39,111]、サル [129]、ラット [26,33,123]、ウシ [13,68,96,115]、ヤギ [88,89,133] 及びヒツジ [35] などの多くの動物種で報告されているが、GHのパルス状分泌パターンは動物種間で異なっている。雄ラットの標準的なGHの分泌パターンは3-3.5時間ごとに現れ、雌ではその間隔は雄より短く、不規則である [123]。ヒトにおいては、女性では男性に比べ、昼間のGH分泌の放出割合が大きい。女性は男性に比べ高い振幅を持つGH放出パターンを示す [39]。男性では、GH分泌の約70%が夜間の前半に出現する [118]。しかし、反芻家畜のGH分泌パターンは複雑で、まだ明解な結論が得られていない。泌乳期の乳牛では、GHの生理的な分泌パターンは約80分間間隔のパルス状分泌パターンを示すと報告されている [68]。育成雌牛では、血中GHは不規則なパルス状分泌パターンを示すことが報告されている [96]。雄ヤギにおいては、GHの分泌パターンは5時間ごとの大きな振幅と1時間ごとの小さな振幅で構成されることが報告されている [89]。またGH分泌のリズムは睡眠の影響を受けることも知られており、ヒツジ [66] 及びヒト [32,118] では、夜間睡眠時にGH分泌が上昇することが報告されている。

GHの分泌は光の影響を受けることが示唆されている。ラット、サル、ヒトにおいては、夜間にGH濃度が上昇することが報告されている [26,45,56]。また夜間に上昇したGHは光暴露により減少し、光暴露終了時に再び上昇の始まることも報告されている [26,29,56,60,62]。最近、ホルスタイン種去勢牛において、夜間のGH濃度は人為的に調節された光環境下で消灯に伴って上昇することが報告された [60]。乳牛では、夜間にGH濃度が上昇し、昼間に下降するような昼夜のリズムが観察されている [68]。さらに、ヤギのGH分泌と日長変化との間に有意な関係のあることが示唆されている。

光条件はラット、サル、ヒトの GH 分泌に影響するだけでなく反芻家畜の GH 分泌にも影響していることが考えられる。しかし、光周期が反芻家畜の GH パルス性状に及ぼす影響についてはまだ明らかにされていない。

PRL は下垂体前葉のプロラクチン分泌細胞 (ラクトロフ) から分泌される蛋白質ホルモンである。PRL のアミノ酸配列は GH と比較的近い。ヒツジ [70] やウシ [125] などの反芻家畜では 199 個のアミノ酸残基からなり分子量は約 23,000 である。PRL の分泌は隆起漏斗ドーパミン作動性神経によって抑制的に支配されいると考えられている。PRL の真の放出因子はまた同定されていない。しかし、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) [34,47,50,80,132]、血管作動性腸ペプチド (VIP) [1,17,46]、オキシトシン (OX) [106] やサルソリノール (SAL) [47-50] などは PRL を放出させることが報告されている。PRL は乳腺の成長と発達 [8]、乳汁の合成を促進し [53,95] 乳汁の分泌を維持する [93]。また雄においてはアンドロジェンと共同して前立腺、精囊腺の発育を促進する [41,92]。このように PRL は GH と同様に家畜の生産に欠かせない重要なホルモンである。

PRL の分泌は多くの外因性及び内因性因子により影響を受ける。特に外因性因子である日長は PRL の分泌に影響を及ぼす重要な要因であることが知られている。ウシ [57,90,96]、ヒツジ [121] 及びヤギ [12] などの反芻家畜の血中 PRL 濃度は春夏に高く、秋冬に低いことが報告されており、PRL の基礎濃度や PRL 放出因子による PRL 放出反応は短日期に比べ長日期は高い。

本研究は、まだ明解な解答が得られていない、反芻家畜における光と GH 分泌パターンとの関係を明らかにしようとした。すなわち、家畜生産に重要な GH の日長による分泌パターンの変化やその機序を、光の影響が顕著に現われる PRL 分泌の変化と対比しながら明らかにしようとした。本研究では、ウシのモデル動物として知られているシバヤギを人工気象室内で飼養して実験を行った。本論文は 5 章からなり、実験成績は以下の各章にまとめた。すなわち、第 2 章では日長変化における昼間及び夜間の雌ヤギの血中 GH 及び PRL の分泌特性と、GHRH による GH 放出反応及び TRH によ

る PRL 放出反応を調べた。また、メラトニン (MEL) が GH と PRL の分泌に与える影響についても調べた。第 3 章では性差を明らかにするために第 2 章と同様の日長条件下で雄ヤギを用いて、雄ヤギの血中 GH と PRL 分泌特性に及ぼす日長の影響を調べた。第 4 章では長日期における GH と PRL 分泌に及ぼす視床下部内ドーパミン (DA) の影響について調べた。

## 第2章

日長が雌ヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響

## 第1節 明期(昼間)におけるGHとPRL分泌パターン

## 1. 緒 言

GHはヒトや多くの動物種でパルス状に放出されることが知られており、GHパルスの振幅と頻度はGHの生理活性発現に重要な役割を演じている [22,27,38]。しかし、反芻家畜のGH分泌パターンは複雑で、GHのパルス状分泌性状の詳細やその分泌機構については良く分っていない。

GHの分泌は視床下部からの促進因子であるGHRHと抑制因子であるソマトスタチンにより二元的に支配されている [11,18,28,38,69,112]。また、その他多くの神経ペプチドなどの影響を受け調節されている。さらに、GHの分泌調節は外因性の環境因子である光の影響を受けている。ラット、サル、ヒトにおいては、夜間にGH濃度が自発的に上昇することが報告されている [26,45,56,85]。また、夜間に上昇したGHは光暴露により減少し、光暴露終了時に再びGHの上昇が始まることが報告されている [26,29,56,60,62]。最近、ウシにおいて、夜間のGH濃度は人為的に照明をコントロールした環境下で消灯後に自発的に上昇することが報告された [60]。また反芻家畜のGH分泌は光周期の影響を受けることが示唆されている [4,5,36]。したがって、光条件はラット、サル、ヒトのGH分泌に影響するだけでなく反芻家畜のGH分泌にも影響する可能性が考えられる。しかし、光とGH分泌との関係についてはまだ明解な回答が得られていない。特にGHパルスと光の関係については分かっていない。

ウシ [57]、ヒツジ [121]、ヤギ [108] 及びシカ [37,108] などの反芻動物の血中PRL濃度は春夏に高く、秋冬に低いことが報告されており、PRLの分泌は日長により影響されることが知られている。そこで、第1節では日長が反芻家畜のGH分泌に及ぼす影響を明らかにするために、ヤギを環境制御室内で飼養し、長日及び短日条件下でのGH分泌パターンをPRLの変化と共に調べた。本実験では、昼間 (明期) におけるGH、PRL分泌特性を調べると共にGHRHによるGH分泌反応及びTRHによるPRL分泌反応に及ぼす影響も検討した。

## 2. 材料及び方法

### 1) 供試動物

供試動物は家畜繁殖学研究室飼養の5～6歳の雌シバヤギ5頭(#11、#13、#14、#17、#22)であった。短日条件及び長日条件実験開始時のヤギの体重は、それぞれ25.0～26.5 kg (平均 ± 標準誤差: 25.6 ± 0.3 kg) 及び23.3～27.5 kg (26.1 ± 0.7 kg) であった。

実験期間中ヤギは、日長、温度及び湿度を制御できる環境制御室内で1頭ずつペンに入れ飼養し、朝8:00-9:00間に1回サイレージと濃厚飼料を十分量の水と共に給餌した。3週間ずつ同一環境内で飼養し、それぞれの環境に十分馴致させたのち、実験を行った。水は実験期間中自由に飲水させた。

### 2) 環境設定

実験期間中に設定した温度、湿度及び照度はそれぞれ20℃、60%及び900ルクスであった。

短日条件では照明時間を8時間明期(08:00-16:00):16時間暗期(16:00-08:00)(8:16 L:D)に設定した。また、長日条件では照明時間を16時間明期(08:00-24:00):8時間暗期(24:00-08:00)(16:8 L:D)に設定した。

### 3) カテーテルの取り付け

採血及びホルモンの投与を行うためにカテーテルを実験前日までに全てのヤギに取り付けた。カテーテルの取り付けは、診断的穿刺法により行った。すなわち、直立した状態で保定したヤギに無麻酔下で頸部腹側よりI.V.カニューラ(Argyle、16G×50 mm、日本シャード株式会社、東京)の先端を外頸静脈内に挿入し、これよりカテーテル(Polyethylene Tubing、No.15、od.1.1 mm、Igarashi Ika Kogyo Co.LTD.、東京)を約20 cm挿入した。カテーテルは頸部に巻いたスポーツテープ(TAPING TAPE、C-type、ニチバン株式会社、東京)で固定し、血液の凝固を防ぐ目的で、その内部をヘパリンカルシウム(カプロシン、三井製薬工業株式会社、東京)で満たした。カテーテルの遊離端は採血日まで、頸部にスポーツテープで固定した。

#### 4) 試薬及び投与

GHRH は、ヒトの GHRH (hGRF-29-NH<sub>2</sub>: 元生命工学業技術研究所、大箸 信一 博士 提供) を用い、実験当日に 0.25 µg/kg body weight (b.w.) になるように生理食塩水で 2 ml に希釈し、エキステンションチューブより静脈内に投与した。投与後はカテーテルとエキステンションチューブ内をヘパリン溶液で満たした。TRH (ペプチド研究所、大阪) は実験当日に 1 µg/kg b.w. になるように生理食塩水で 2 ml に希釈し、GHRH と同様に投与した。

#### 5) 採血方法

GH 及び PRL の分泌パターンを調べた実験ではそれぞれの日長条件下の 12:00 から 16:00 までの間 (明期 4 時間)、15 分間隔で計 17 回採血を行った。

GHRH 及び TRH の投与実験は 2 日間隔で行い、12:00 から 15:00 までの間 (明期 3 時間) 採血を行った。採血は 15 分間隔で計 13 回行い、GHRH 及び TRH の投与は採血開始 60 分後に行った。

採血は予め挿入しておいた留置カテーテルにエキステンションチューブ (JSM エキステンションチューブ 200 mm、株式会社ジェイ・エム・エス、広島) を付けて行った。採血量は 1 回当たり 2.5 ml で、予め 25 µl のヘパリンカルシウム (100 IU/ml) を滴下しておいた 5 ml 試験管に入れ、実験終了まで 4°C で保存した。採血後は、0.5% ヘパリン溶液でカテーテル及びエキステンションチューブ内を満たした。採取した血液は 3000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、血漿を回収した。血漿はホルモン測定当日まで -30°C で保存した。

#### 6) ホルモン濃度の測定

##### (1) 血漿中 GH 濃度の測定

血漿中 GH 濃度の測定は、上家の方法 [55] に準じた二抗体法を用いたラジオイムノアッセイ (RIA) により行った。標識ホルモンにはウシ GH (USDA-bGH-B-1、USDA、USA) を用い、クロラミン T 法により、<sup>125</sup>I (NEZ 033A、NEZ 社、USA) で標識した。標識ホルモンと非標識ホルモンとの分離は Sephadex G-75 (Pharmacia 製、Sweden) を

用いたゲル濾過法によって行った。第一抗体には、ウシ GH をサルに免疫して得られた抗ウシ GH サル血清 (anti-b GH、元農林水産省畜産試験場、上家 哲 博士 提供) を用い、これを 1/20,000 に希釈して使用した。第二抗体には、抗サル  $\gamma$  グロブリンヤギ血清 (元群馬大学内分泌研究所、若林克己教授 提供) を用い、ポリエチレングリコール (Polyethylenglycol 6,000、平均分子量 7,500、和光純薬工業、大阪) を 5% 含む緩衝液で 1/120 に希釈して使用した。標準曲線作成のための標準ホルモンには、ウシ GH (USDA-bGH-b-1、USDA、USA) を用いた。アッセイに用いたサンプル量は 100  $\mu$ l であった。サンプルのインキュベーションは、第一抗体 50  $\mu$ l 添加後 2 日間、標識ホルモン 50  $\mu$ l 添加後 3 日間、さらに第二抗体 100  $\mu$ l 添加後一晩、4°C 下で行った。インキュベーション終了後、3,000 rpm、4°C の条件下で 30 分間遠心分離を行った。デカンテーションにより上澄みを除去した後、ウェル型  $\gamma$  カウンター (ARC-1000M、Aloka 社製) で沈殿部分の  $\gamma$  線量を測定した。すべての試料は、二重測定を行った。アッセイは 1 回で行い、測定限界値は 0.25 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 5.4% であった。

## (2) 血漿中 PRL 濃度の測定

血漿中の PRL 濃度は、二抗体法を用いた RIA により測定した。標識ホルモンにはヒツジ PRL (NIDDK-oPRL-1-3、NIDDK、USA 提供) を用いてクロラミン T 法により  $^{125}$ I で標識した。標識ホルモンと非標識ホルモンとの分離は Sephadex G-75 (Pharmacia 製、Sweden) を用いてゲル濾過法で行った。第一抗体には、ヒツジ PRL をウサギに免疫して作製したヒツジ PRL 抗血清 (NIDDK-Anti-oPRL-2、NIDDK、USA 提供) を用い、これを 1/90,000 に希釈して使用した。第二抗体には、抗ウサギ IgG ヤギ血清 (RK-GAR、Phoenix Pharmaceuticals、USA) を用い、ポリエチレングリコール (Polyethylenglycol 6,000、平均分子量 7,500、和光純薬工業、大阪) を 5% 含む緩衝液で 1/26 に希釈して使用した。標準曲線作製のための標準ホルモンにはヒツジ PRL (NIDDK-oPRL-1-3、NIDDK、USA 提供) を用いた。インキュベーションは、第一抗体 50  $\mu$ l 及び標識ホルモン 50  $\mu$ l 添加後 2 日間、第二抗体 100  $\mu$ l 添加後 1 晩、4°C 下で行った。インキュベーション終了後、3,000 rpm、4°C の条件下で 30 分間遠心分離を行った。デカンテーショ

ンにより上澄みを除去した後、ウェル型  $\gamma$  カウンター (ARC-1000M、Aloka 社製) で沈殿部分の  $\gamma$  線量を測定した。アッセイに用いたサンプル量は 20  $\mu$ l であり、すべて二重測定を行った。アッセイは 1 回で行い、測定限界値は 0.11 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 2.2%であった。

#### 7) データ分析

RIA で得られたデータは、実験支援プログラム (元群馬大学内分泌研究所、若林克己教授 提供) により処理した [122]。パルスの検定は Ellis らの方法 [30] を一部修正し行った。すなわち、測定結果より得られたグラフ上で、濃度の変動が 4 点以上からなる三角形状の部分を仮のパルスとし、仮のパルスの上昇部分を構成する全ての測定値より求めた変動係数と下降部分について同様に求めた変動係数の両方が、アッセイ内変動係数の 2 倍以上であるとき、これを真のパルスとした。パルスの頻度は 1 時間当たりのパルス出現回数とした。パルスの振幅はパルスの頂値より、そのパルスの上昇部分の最低値を差し引いた値とした。

得られたデータは全て平均値 $\pm$ 標識誤差で示した。頻度、振幅及び平均濃度のデータは Student の t 検定を用い有意差を検討した。試薬投与後の GH 及び PRL 濃度における投与前との有意差は、One-way repeated measures ANOVA を用いて分散分析を行い、Newman-Keuls 検定により各間における有意差を検定した。試薬投与後の GH 及び PRL 濃度における実験区の有意差は、Two-way ANOVA を用いて分散分析を行い、Bonferroni 検定により各間における有意差を検定した。また GHRH 投与後 60 分間の GH 放出面積 (AUC) を算出した。AUC の値は Student の t 検定を用い有意差を検討した。すべてのデータは GraphPad Prism (GraphPad Software、San Diego、CA、USA) を用いて解析した。

### 3. 結果

#### 1) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GH パルス状分泌の変化

5 頭における血漿中 GH 濃度の変化は Fig.1 に示すとおりである。各個体とも GH はパルス状に分泌した。各個体の GH パルスの性状は次のとおりであった。

#11 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 1 回/4 h 及び 1 回/4 h、振幅は 32.7 ng/ml 及び 1.0 ng/ml、平均 GH 濃度は  $6.5 \pm 1.6$  ng/ml 及び  $1.5 \pm 0.2$  ng/ml であった。

#13 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 2 回/4 h 及び 0 回/4 h、振幅は  $1.4 \pm 0.2$  ng/ml 及び 0 ng/ml、平均 GH 濃度は  $2.0 \pm 0.4$  ng/ml 及び  $1.3 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#14 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 2 回/4 h 及び 2 回/4 h、振幅は  $7.8 \pm 6.1$  ng/ml 及び  $1.6 \pm 0$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $3.4 \pm 0.6$  ng/ml 及び  $2.1 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#17 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 2 回/4 h 及び 4 回/4 h、振幅は  $4.1 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $1.9 \pm 0.4$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $3.9 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $2.0 \pm 0.2$  ng/ml であった。

#22 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 2 回/4 h 及び 3 回/4 h、振幅は  $4.6 \pm 3.6$  ng/ml 及び  $1.8 \pm 0.7$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $2.9 \pm 0.7$  ng/ml 及び  $1.6 \pm 0.2$  ng/ml であった。

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GH パルスの頻度、振幅及び平均 GH 濃度を 5 頭の平均値で Table 1 に示す。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における GH パルスの頻度はそれぞれ  $0.5 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.5 \pm 0.2$  回/h で有意差は見られなかった。GH パルスの振幅はそれぞれ  $7.6 \pm 3.4$  ng/ml 及び  $1.5 \pm 0.2$  ng/ml で 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度はそれぞれ  $3.7 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $1.7 \pm 0.1$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。

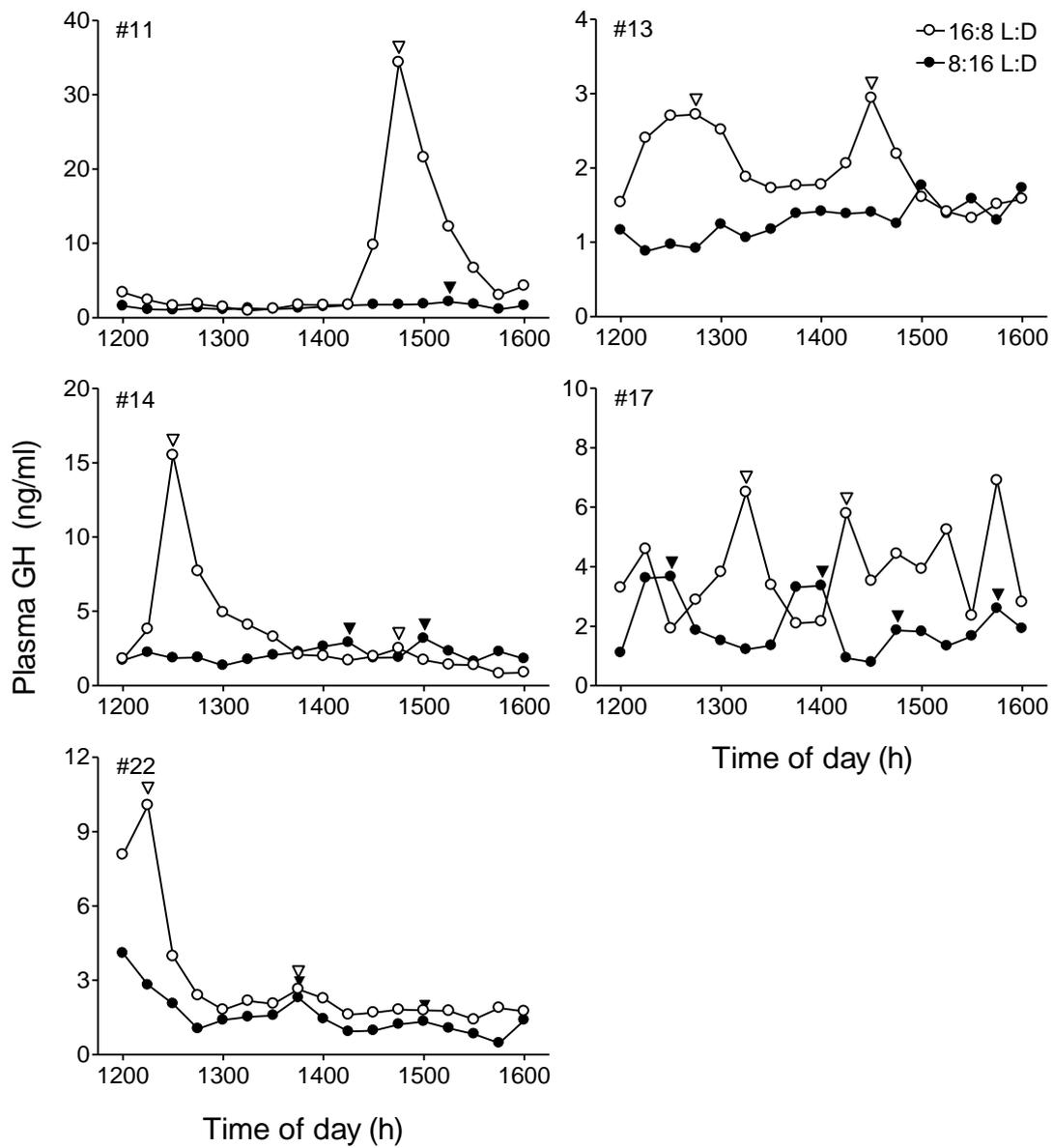


Fig. 1. Fluctuations in plasma concentrations of growth hormone (GH) for 4 h (12:00 to 16:00 hours) in goats (#11, #13, #14, #17, #22). Goats were kept under 16 h of light and 8 h of darkness (16:8 L:D) or 8 h of light and 16 h of darkness (8:16 L:D). Room temperature was kept at 20°C. Triangles (▽16:8 L:D; ▼8:16 L:D) indicate GH pulses.

**Table 1** Characteristics of GH pulses for 4 h (12:00 to 16:00 hours)

	16:8 L:D	8:16 L:D
Frequency (pulses/h)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2
Amplitude (ng/ml)	7.6 ± 3.4*	1.5 ± 0.2*
Mean GH (ng/ml)	3.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>

Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. The room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean ± SEM for five goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ). \*  $P = 0.1$ .

## 2) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GHRH による GH 放出反応

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GHRH 投与後の血漿中 GH 濃度の変化と GHRH 投与後 60 分間の平均 GH 放出面積 (AUC) を 5 頭の平均値で Fig.2 に示す。GHRH を投与すると、16 : 8 L : D 区及び 8 : 16 L : D 区とも血漿中 GH 濃度は投与後直ちに上昇し、投与後 15 分をピークとする GH の一過性放出が見られた。GH のピーク値は 8 : 16 L : D 区 ( $37.5 \pm 9.2$  ng/ml) に比べ 16 : 8 L : D 区 ( $51.4 \pm 10.5$  ng/ml) は高かった。GHRH 投与後 60 分間の AUC では、8:16 L:D 区 ( $775.0 \pm 174.1$  ng·min·ml<sup>-1</sup>) に比べ 16:8 L:D 区 ( $1251.8 \pm 302.2$  ng·min·ml<sup>-1</sup>) は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

## 3) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における PRL パルス状分泌の変化

5 頭における血漿中 PRL 濃度の変化は Fig.3 に示すとおりである。各個体の PRL パルス性状は次のとおりであった。

#11 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 2 回/4 h 及び 1 回/4 h、振幅は  $14.4 \pm 2.8$  ng/ml 及び  $0.3$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $20.2 \pm 1.3$  ng/ml 及び  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#13 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/4 h 及び 2 回/4 h、振幅は  $19.9$  ng/ml 及び  $1.1 \pm 0$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $25.6 \pm 1.5$  ng/ml 及び  $1.4 \pm 0.2$  ng/ml であった。

#14 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/4 h 及び 3 回/4 h、振幅は  $21.5$  ng/ml 及び  $2.9 \pm 0.5$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $30.8 \pm 2.8$  ng/ml 及び  $5.3 \pm 0.8$  ng/ml であった。

#17 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/4 h 及び 1 回/4 h、振幅は  $0$  ng/ml 及び  $1.4$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $32.8 \pm 1.4$  ng/ml 及び  $3.5 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#22 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/4 h 及び 2 回/4 h、振幅は  $0$  ng/ml 及び  $3.8 \pm 1.4$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $33.1 \pm 1.6$  ng/ml 及び  $5.6 \pm 0.7$  ng/ml であった。

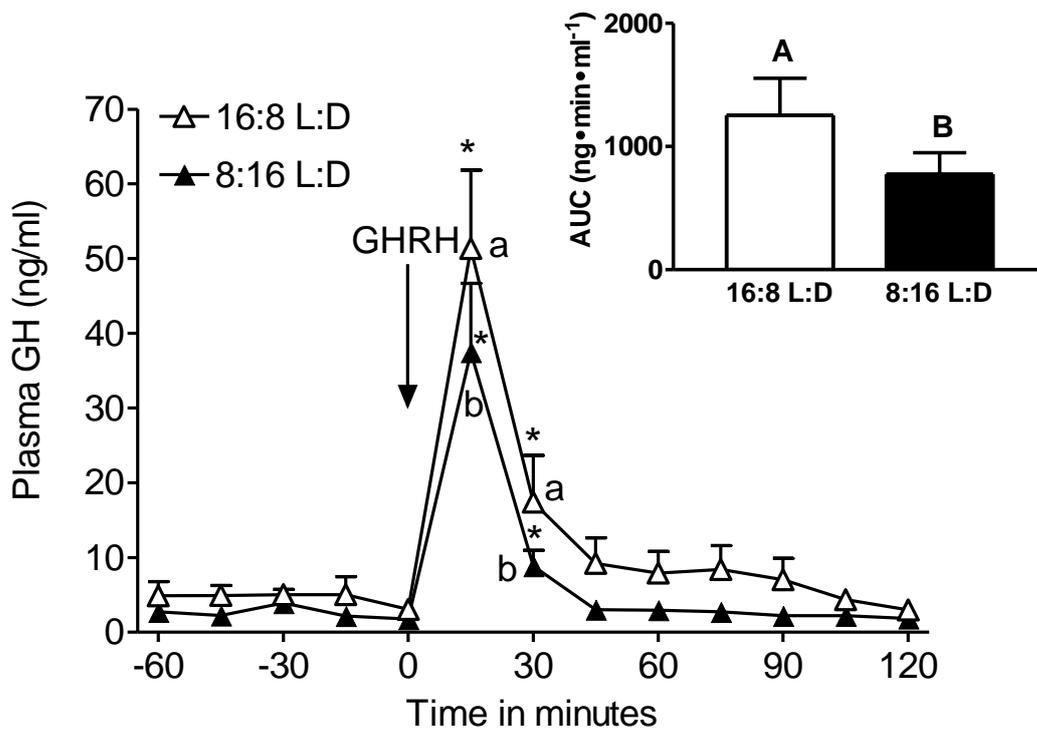


Fig. 2. Plasma concentrations of GH in response to intravenous (i.v.) injections of GH-releasing hormone (GHRH, 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight (b.w.)) in the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Note that the area under the GH response curve (AUC) for the 1-h period after i.v. injections of GHRH is also indicated in the figure. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for five goats. \* $P < 0.05$  compared with the pre-injection values. The different letters (a, b) for each time denote significant differences ( $P < 0.05$ ). The different letters (A, B) on the bar denote significant differences ( $P < 0.05$ ).

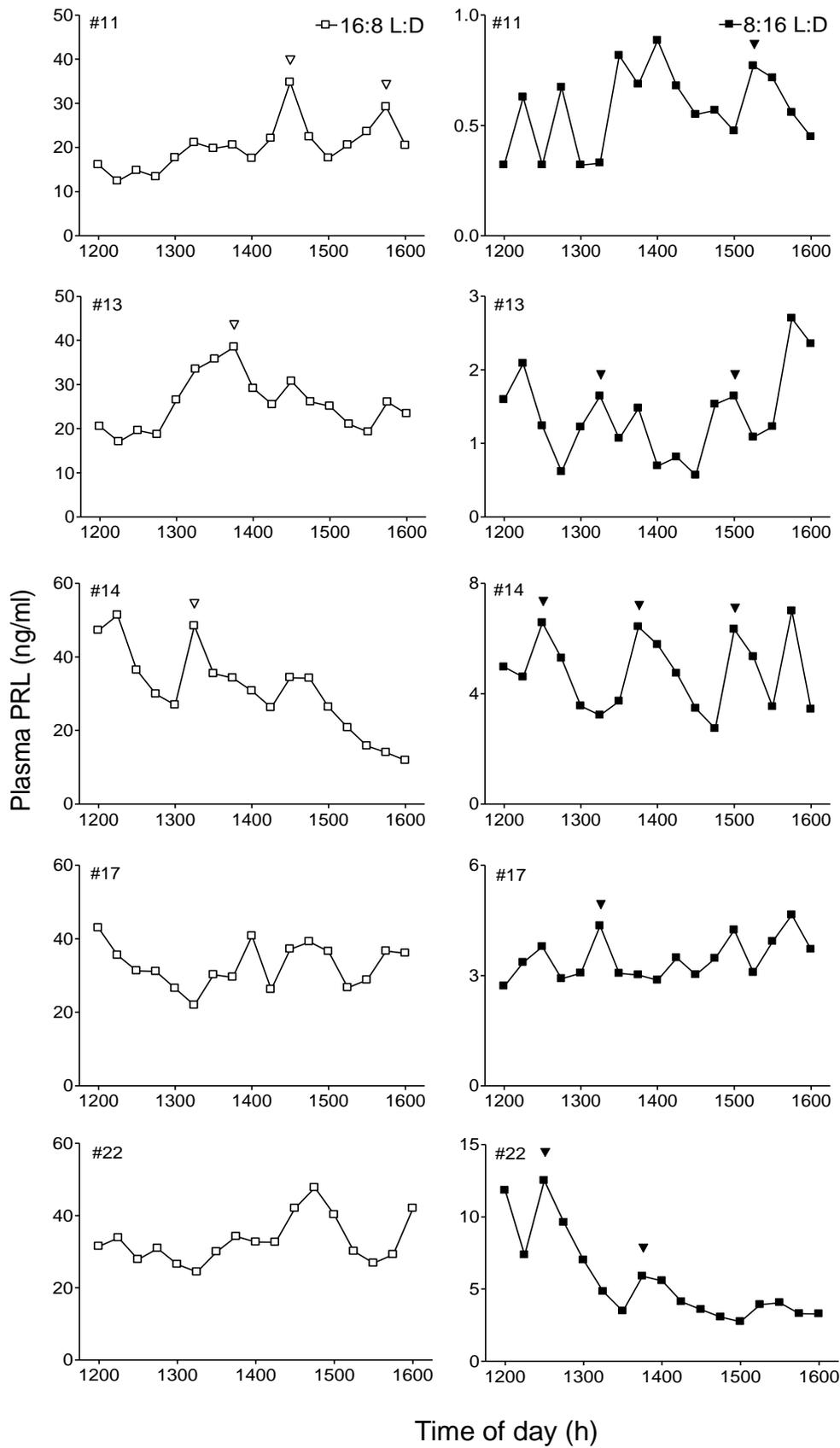


Fig. 3. Fluctuations in the plasma concentrations of prolactin (PRL) for 4 h (12:00 to 16:00 hours) in goats (#11, #13, #14, #17, #22). Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Triangles (▽ 16:8 L:D; ▼ 8:16 L:D) indicate PRL pulses.

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における PRL パルスの頻度、振幅及び平均 PRL 濃度を 5 頭の平均値で Table 2 に示す。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の明期 4 時間における PRL パルス頻度はそれぞれ  $0.2 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.5 \pm 0.1$  回/h で、8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は低い傾向にあった ( $P < 0.1$ )。しかし、PRL パルスの振幅はそれぞれ  $17.6 \pm 2.2$  ng/ml 及び  $2.2 \pm 0.5$  ng/ml で 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 PRL 濃度はそれぞれ  $28.5 \pm 3.9$  ng/ml 及び  $3.3 \pm 1.3$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

#### 4) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における TRH による PRL 放出反応

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における TRH 投与後の血漿中 PRL 濃度の変化を 5 頭の平均値で Fig.4 に示す。TRH を投与すると、16 : 8 L : D 区及び 8 : 16 L : D 区とも血漿中 PRL 濃度は投与 15 分後急激に上昇した。投与 15 分後の PRL のピーク値はそれぞれ  $632.2 \pm 92.5$  ng/ml 及び  $64.9 \pm 20.8$  ng/ml であった。投与後 120 分間の PRL 濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

**Table 2** Characteristics of PRL pulses for 4 h (12:00 to 16:00 hours)

	16:8 L:D	8:16 L:D
Frequency (pulses/h)	0.2 ± 0.1 <sup>*</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>*</sup>
Amplitude (ng/ml)	17.6 ± 2.2 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.5 <sup>b</sup>
Mean PRL (ng/ml)	28.5 ± 3.9 <sup>a</sup>	3.3 ± 1.3 <sup>b</sup>

Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. The room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean ± SEM for five goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ). \*  $P < 0.1$ .

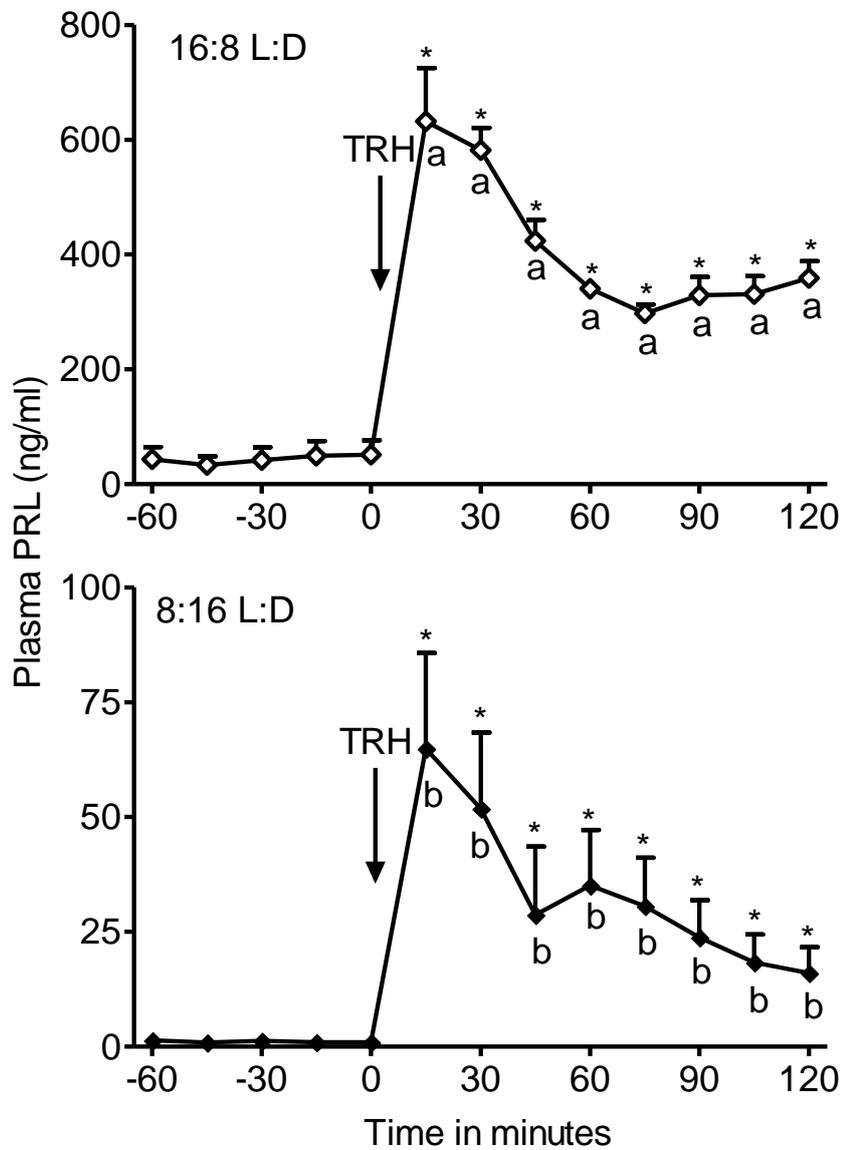


Fig. 4. Plasma concentrations of PRL in response to i.v. injections of thyrotrophin-releasing hormone (TRH, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) in the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for five goats. \* $P < 0.05$  compared with the pre-injection values. The different letters (a, b) for each time denote significant differences ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 考 察

GHは多くの動物種でパルス状に分泌されるが、反芻家畜のGH分泌形態は複雑である。雄ラットのGH分泌は約3.3時間の一定間隔でパルス状に放出されている [114]。しかし、未経産牛 [96]、泌乳牛 [90] 及び雄牛 [128] のGH分泌はラットGHのように一定のパルス状分泌パターンは観察されていない。本研究において、ヤギのGHは不規則なパルス状分泌パターンを示し大きいパルスと小さなパルスが混在していた。Mogi [88] らは、去勢及び未去勢ヤギのGH分泌はほぼ規則的な等間隔で1日当たり4-5回の大きい振幅のパルスで構成されることを報告した。しかし、本研究結果ではこのような規則的なパルスは観察されなかった。

本研究において、日長時間の延長により、明期の平均PRL濃度は有意に上昇した。光周期によるPRL分泌の影響は視床下部一下垂体軸を経由して起こる [23,81]。したがって、日長時間の延長によりヤギのGH分泌が高まったのは光周期のシグナルを視床下部一下垂体軸が感受した結果であると考えられる。

8 : 16 L : Dに比べ16 : 8 L : D区のGHパルスの振幅は大きい傾向が見られた。また16 : 8 L : D区では、大きなGHパルスが出現した。したがって、長い光周期によるGH濃度の亢進は主にパルス振幅の増加に伴うGH濃度の上昇結果に起因すると考えられた。本研究の長日条件がGH分泌を亢進した結果はヒツジとヤギで得られた結果を支持する [36,51]。

メラトニン、ウシにおいても他の動物種と同様に昼間に低く夜間に高いサーカディアンリズムを示す [2,9,51]。このメラトニンの分泌パターンは日長のシグナルを生体に知らせる重要な要因の一つである [2]。また、メラトニン処理によりラットの視床下部組織中のソマトスタチン分泌を刺激することが報告されている [101]。長日期では、短日期に比べメラトニンの濃度が低いと考えられ、短日条件下にメラトニンがソマトスタチン分泌を刺激することによって、GHの振幅が低くなったことが示唆される。また、平均GH濃度はパルス頻度より、パルス振幅と関係するので、本研究では、長日条件下のGH濃度は短日条件下の濃度に比べGH濃度が高くなったと考えられる。

GHRH投与によるGH放出反応は、8 : 16 L : Dより16 : 8 L : Dの方が持続的にGHを分泌させた。この結果は子牛 [102] 及び去勢ヤギ [44] の結果と一致するかもしれない。日長変化はヤギにおいてGHRHによるGH放出に影響を与えることが示唆された。

短日条件に比べ長日条件下の平均PRL濃度は極めて高かった。この結果は季節変化によるウシ、ヤギ、ヒツジ、シカのPRL変化の結果と一致した [12,37,57,108,121]。長日条件においては下垂体内のラクトロフ数を増やし、下垂体内におけるPRL蓄積量や合成速度の増加を引き起こす [23]。一方、短日条件では下垂体前葉のPRLの蓄積量、合成速度が抑制される [23]。したがって、16 : 8 L : Dでは、下垂体のPRL蓄積量が増加し、さらにPRL合成速度が速まったため、8 : 16 L : Dと比べて平均PRL濃度またはTRHによるPRL放出反応が高くなったと推察される。PRL分泌は主に視床下部から放出されるDAにより抑制的に支配されているが [7]、DAはPRLの季節変化とは直接関係しないことも報告されている [34]。

本研究の結果から日長時間の延長によりGH、PRL分泌は共に亢進することが明らかになった。GHの亢進は主にパルス振幅の増加に伴うGH濃度の上昇であることが分かった。またGHRHによるGH分泌は日長の延長により亢進することも明らかになった。

## 5. 要 約

第1節では、日長変化に伴う明期（昼間）の雌ヤギの GH 及び PRL 分泌特性を調べた。また、GHRH による GH 放出反応及び TRH による PRL 放出反応も合わせて検討した。実験は 20°C 下で日長を 8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に変化させ行った。

8 : 16 L : D 区及び 16 : 8 L : D 区の GH パルス頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に GHRH を投与後 60 分間の AUC では、8:16 L:D 区に比べ 16:8 L:D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の PRL パルス頻度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は低い傾向にあった ( $P<0.1$ )。PRL パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 PRL 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に THR を投与した結果、投与後 120 分間の PRL 濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。

以上の結果から、日長を延長させると GH、PRL 分泌は共に亢進することが明らかになった。GH の亢進は主にパルス振幅の増加に伴う GH 濃度の上昇であることが分かった。また GHRH による GH 分泌は日長延長により亢進することも明らかになった。

## 第2節 暗期 (夜間) における GH と PRL 分泌パターン

## 1. 緒 言

最近、ウシにおいて、人工照明環境下における夜間時の GH 濃度は消灯後自発的に上昇することが報告された [60]。夜間に GH 濃度が自発的に上昇することはラット、サル、ヒトなどにおいて報告されている [26,45,56]。しかし、夜間に上昇した GH は光暴露により減少し、光暴露終了後に再び戻る [26,29,56,60,62] ため、光は GH の外因性影響因子の 1 つであることが推察される。

反芻家畜の GH 分泌は光周期の影響を受けることが示唆されている [4,5,36]。また、ヤギの GH 分泌は日長変化により有意な影響を受けることが報告されている [4,5,36]。第 1 節では日長変化による昼間 (明期) の GH と PRL の変化を調べ、日長時間の延長により、明期の GH パルスの振幅は大きくなる傾向が見られると共に平均 GH 濃度は有意に上昇することを明らかにした。しかし、夜間の GH の分泌形態についてはまだ検討していない。

そこで本節では、第 1 節と同様にヤギを環境制御室内で飼養し、日長を変化させた時の暗期 (夜間) における GH の分泌パターンを PRL の変化と共に調べた。

## 2. 材料及び方法

### 1) 供試動物

供試動物は家畜繁殖学研究室飼養の 5~6 歳の雌シバヤギ 4 頭 (#11、#13、#17、#22) であった。短日条件及び長日条件実験開始時のヤギの体重は、それぞれ 25.0~26.5 kg ( $24.8 \pm 0.7$  kg) 及び 23.3~27.5 kg ( $25.5 \pm 0.8$  kg) であった。

実験期間中ヤギは、日長、温度及び湿度を制御できる環境制御室内で 1 頭ずつペンに入れ飼養し、朝 8:00 - 9:00 間に 1 回サイレージと濃厚飼料を十分量の水と共に給餌した。3 週間ずつ同一環境内で飼養し、それぞれの環境に十分馴致させたのち、実験を行った。水は実験期間中自由に飲水させた。

### 2) 環境設定

第 1 節の実験で記述した方法に従った。

### 3) カテーテルの取り付け

第 1 節の実験で記述した方法に従った。

### 4) 採血方法

16:8L:D 及び 8:16L:D における採血は Fig.5 に示すように、消灯 1 時間前から消灯後 8 時間まで 15 分間隔で計 37 回行った。

血液の採取方法は第 1 節の実験で記述した方法に従った。

### 5) ホルモン濃度の測定

第 1 節の実験で記述した方法に従った。

### 6) データ分析

第 1 節の実験で記述した方法に従った。



### 3. 結果

1) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における暗期 8 時間における GH パルス状分泌の変化

4 頭における血漿中 GH 濃度の変化は Fig.6 に示すとおりで、各個体とも GH はパルス状に分泌した。各個体の GH パルスの性状は次のとおりであった。

#11 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における GH パルスの頻度は 4 回/8 h 及び 5 回/8 h、振幅は  $9.3 \pm 7.3$  ng/ml 及び  $1.3 \pm 0.2$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $5.0 \pm 1.2$  ng/ml 及び  $1.7 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#13 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における GH パルスの頻度は 6 回/8 h 及び 2 回/8 h、振幅は  $1.9 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $2.6 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $1.5 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#17 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における GH パルスの頻度は 6 回/8 h 及び 4 回/8 h、振幅は  $6.3 \pm 1.5$  ng/ml 及び  $3.1 \pm 1.3$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $4.5 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $2.0 \pm 0.2$  ng/ml であった。

#22 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における GH パルスの頻度は 3 回/8 h 及び 6 回/8 h、振幅は  $3.1 \pm 1.7$  ng/ml 及び  $2.5 \pm 1.2$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $2.7 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $2.1 \pm 0.3$  ng/ml であった。

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GH パルスの頻度、振幅及び平均 GH 濃度を 4 頭の平均値で Table 3 に示す。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における GH パルスの頻度はそれぞれ  $0.6 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.5 \pm 0.1$  回/h で有意差は見られなかった。GH パルスの振幅はそれぞれ  $5.1 \pm 1.6$  ng/ml 及び  $2.1 \pm 0.5$  ng/ml で、8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度はそれぞれ  $3.7 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $1.8 \pm 0.1$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。

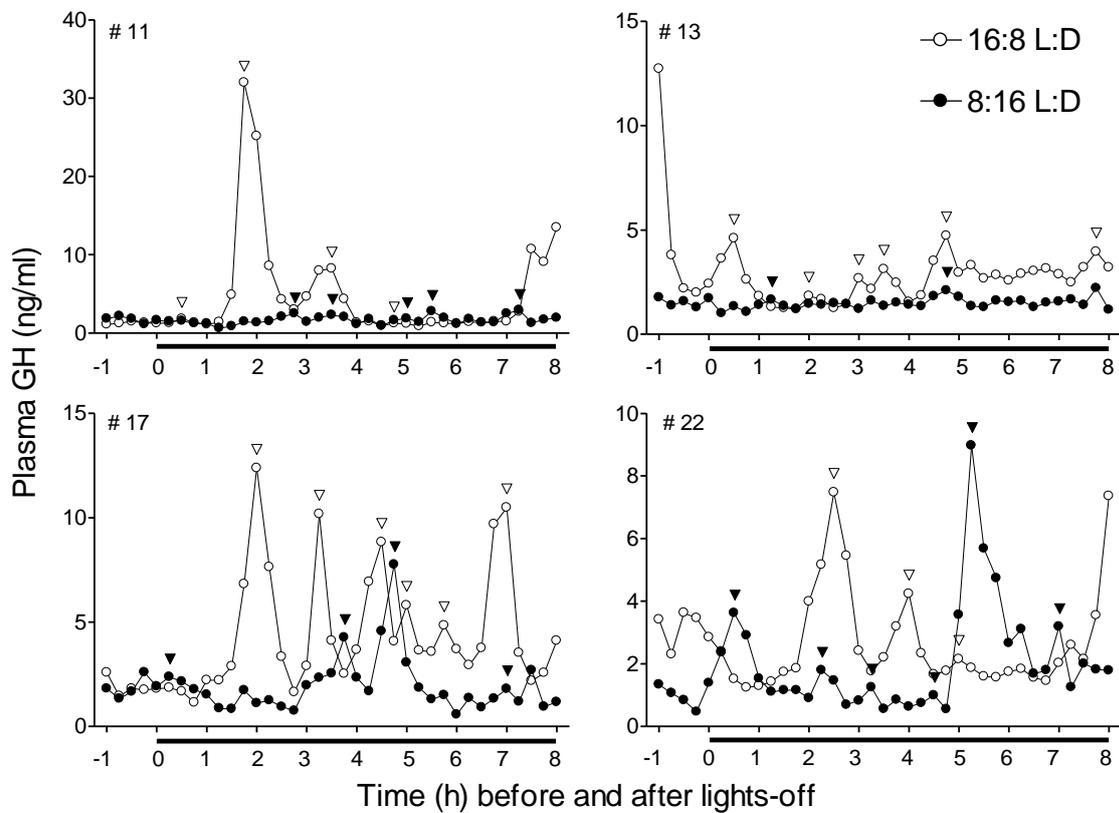


Fig. 6. Fluctuations in the plasma concentrations of GH before (1-h light period; -1 to 0 h) and after (8-h dark period; 0 to 8 h) light-off in goats (#11, #13, #17, #22). Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Triangles ( $\nabla$  16:8 L:D;  $\blacktriangledown$  8:16 L:D) indicate GH pulses. The bar indicates the dark period.

**Table 3** Characteristics of GH pulses for 8 h after light-off

	16:8 L:D	8:16 L:D
Frequency (pulses/h)	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Amplitude (ng/ml)	5.1 ± 1.6*	2.1 ± 0.5*
Mean GH (ng/ml)	3.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup>

Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. The room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean ± SEM for four goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ). \* $P = 0.1$

3) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における暗期 8 時間における PRL パルス状分泌の変化

4 頭における血漿中 PRL 濃度の変化は Fig.7 に示すとおりであった。

#11 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/8 h 及び 4 回/8 h、振幅は 56.3 ng/ml 及び  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $40.3 \pm 3.8$  ng/ml 及び  $1.1 \pm 0.2$  ng/ml であった。

#13 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/8 h 及び 0 回/8 h、振幅は 53.5 ng/ml 及び 0 ng/ml、平均 PRL 濃度は  $38.7 \pm 2.0$  ng/ml 及び  $1.8 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#17 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/8 h 及び 1 回/8 h、振幅は 0 ng/ml 及び 3.7 ng/ml、平均 PRL 濃度は  $42.4 \pm 1.9$  ng/ml 及び  $6.1 \pm 0.3$  ng/ml であった。

#22 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/8 h 及び 3 回/8 h、振幅は 48.0 ng/ml 及び  $17.1 \pm 6.2$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $72.0 \pm 3.7$  ng/ml 及び  $10.1 \pm 1.4$  ng/ml であった。

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における PRL パルスの頻度、振幅及び平均 PRL 濃度を 4 頭平均値で Table 4 に示す。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期 8 時間における PRL パルス頻度はそれぞれ  $0.1 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.3 \pm 0.1$  回/h で有意差は見られなかった。PRL パルスの振幅はそれぞれ  $52.6 \pm 2.4$  ng/ml 及び  $7.2 \pm 3.6$  ng/ml で、8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 PRL 濃度はそれぞれ  $48.4 \pm 1.9$  ng/ml 及び  $4.8 \pm 0.5$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における暗期 8 時間における平均 PRL 濃度の変化を Fig.8 に示す。16 : 8 L : D 区の消灯後の平均 PRL 濃度は急激に上昇し、消灯前 (-1 から 0 まで) の平均値に比べ、消灯後 1 時間から 2.25 時間までの値は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。また 8 : 16 L : D 区でも平均 PRL 濃度は消灯後上昇する傾向が見られた。

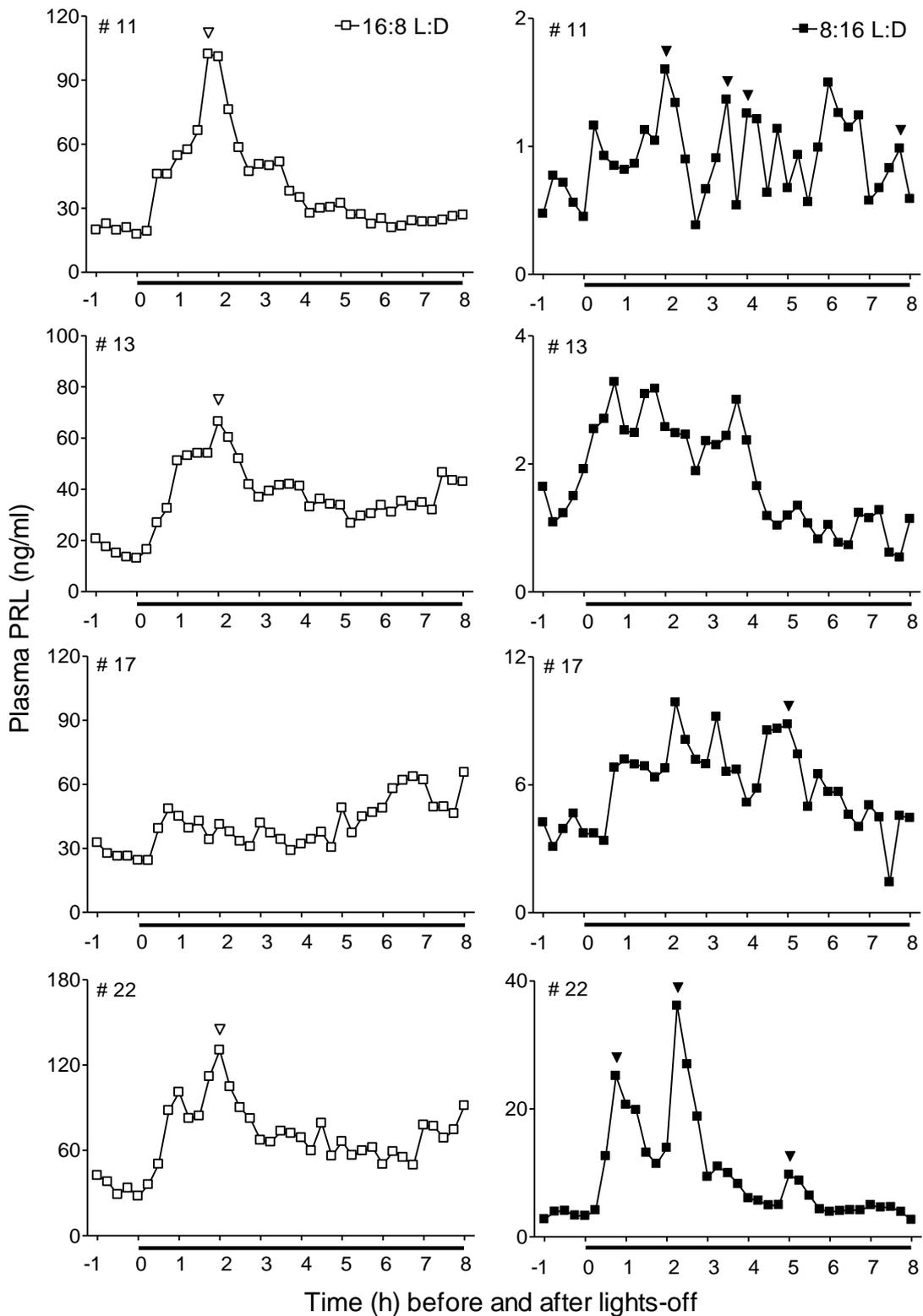


Fig. 7. Fluctuations in the plasma concentrations of PRL before (1-h light period; -1 to 0 h) and after (8-h dark period; 0 to 8 h) light-off in goats (#11, #13, #17, #22). Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Triangles (▽ 16:8 L:D; ▼ 8:16 L:D) indicate PRL pulses. The bar indicates the dark period.

**Table 4** Characteristics of PRL pulses for 8 h after light-off

	16:8 L:D	8:16 L:D
Frequency (pulses/h)	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Amplitude (ng/ml)	52.6 ± 2.4 <sup>a</sup>	7.2 ± 3.6 <sup>b</sup>
Mean PRL (ng/ml)	48.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.5 <sup>b</sup>

Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiod. The room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean ± SEM for four goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

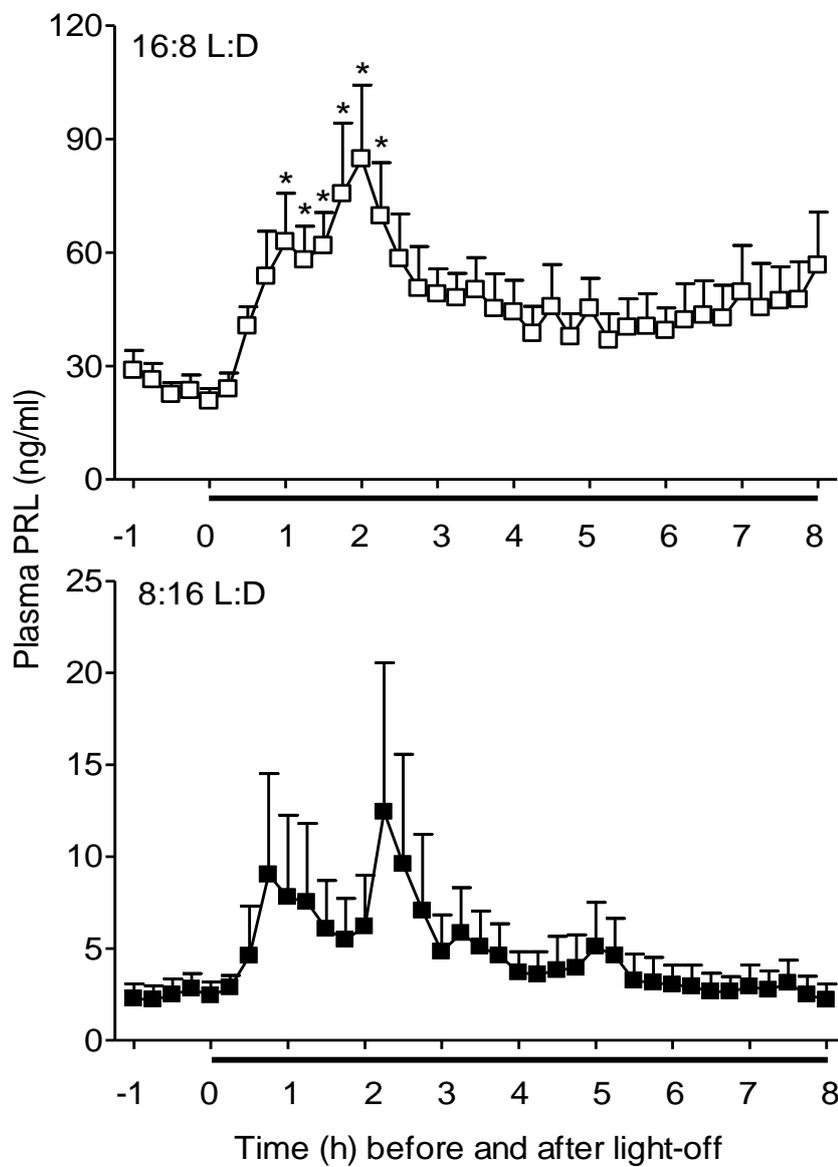


Fig. 8. Average plasma concentrations of PRL before (1-h light period; -1 to 0 h) and after (8-h dark period; 0 to 8 h) light-off in goats. Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. The bar indicates the dark period. \* $P < 0.05$  compared with the pre-lights off values.

#### 4. 考 察

暗期におけるヤギの GH 分泌パターンは明期と同様に不規則なパルス状分泌パターンを示し、大きいパルスと小さなパルスが混在していた。ラット、サル、ヒト、ウシにおいては、夜間になると GH 濃度が自発的に上昇することが報告されている [26,32,45,56,60]。一方、ウシにおいて夜間にこのような自発的な GH 濃度の上昇は認められなかったことも報告されている [13,59,67,87,90,96]。本研究では消灯後に GH 濃度の自発的な上昇現象は観察されず、ヤギでは夜間に GH 濃度の上昇現象は認められないとの既報の報告を支持した [88,133]。

Kasuya [60] らは、去勢牛の血漿中GH濃度は夜間の0-2時の間に大きな上昇が見られることを報告している。本研究の8：16L：D及び16：8L：Dの暗期のサンプルの採取時間はそれぞれ16-24時及び24-8時であるが、ウシのような深夜時のGH濃度の自発的な上昇現象は認められなかった。GH分泌のリズムは睡眠により強い影響を受けることが知られており、ヒト [32,118] 及びヒツジ [66] では、夜間睡眠時にGH分泌が上昇する。本研究では採血のためヤギの睡眠状態が良くなく、深夜時の採血を行ってもGH濃度の自発的な上昇現象が認められなかったのかもしれない。

最近、ホルスタイン種去勢牛において GH 濃度のピークが、ほぼ等間隔に 1 日当たり 4 回現われたことが報告された [59]。また去勢ヤギ及び未去勢ヤギでもほぼ等間隔に 1 日当たり 5 回現われることが報告された [88]。また、雌及び雄ヤギにおける GH 分泌パターンも一定のパルス状分泌パターンを示すとの報告も見られる [88,133]。しかし、これらの報告のような GH の規則な分泌パターンは本研究では認められなかった。この差は飼育環境の差に起因するかもしれない。すなわち、これらの実験は 12：12 L：D の条件下で行っていた。ウシの実験においては、エサは 08：30 及び 15：30 に 1 日 2 回給与し、水は自由に飲水させていた [59]。ヤギの実験においては、エサは自由に採取させ、水も自由飲水させていた [88,133]。しかしながら、飼育環境差の他にそれぞれの実験に使用された動物間の遺伝的な差も影響していることも考えられる。

16：8L：D 区の消灯後の平均 PRL 濃度は有意に上昇し、8：16L：D 区でも平均 PRL

濃度は消灯後上昇する傾向が見られた。PRL の放出反応は 8:16 L:D 区より 16:8 L:D 区において高いことが明らかになった。本研究の照明変化に対する PRL 放出反応は Lincoln [77] らが報告したヒツジの結果と似ている。すなわち、血漿中 PRL 濃度のピークの出現は暗期の初めに起こり、その PRL 放出反応は短日条件より長日条件の方が著しかった。光周期に伴う PRL 分泌パターンの変化には松果体から分泌されるメラトニンが関係している。メラトニンは昼間に低く夜間に高いサーカディアンリズムを示し [2,9,51]、消灯直後からメラトニンの分泌量は明らかに上昇する [2,60]。本研究では消灯後の平均 PRL 濃度の上昇現象は消灯直後のメラトニンの分泌パターンと類似したが、GH の変化には PRL のような消灯後の上昇現象は見られなかった。

光周期が夜間の GH 分泌に影響する詳細なメカニズムは、まだ明らかにされていない。しかしながら、メラトニンはこれらのメカニズムに関係しているかもしれない。暗期の長さはメラトニンの分泌量として反映される [2]。メラトニン処理はラットの視床下部内のソマトスタチン分泌を刺激することが報告されている [101]。したがって、メラトニンがソマトスタチン分泌を促進して GH 分泌を抑制することが考えられる。光周期による GH 分泌特性はメラトニンによって仲介されていることが示唆される。

本研究の結果から、日長を延長すると、暗期における GH 分泌は亢進するが、GH には PRL のような消灯直後に上昇する現象は見られないことが明らかになった。

## 5. 要 約

第2節では、日長変化に伴う暗期（夜間）の雌ヤギの GH 及び PRL 分泌特性を調べた。20℃下で日長を 8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に変化させ実験を行った。

8 : 16 L : D 区及び 16 : 8 L : D 区の GH パルスの頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の暗期における PRL パルス頻度には有意な変化は見られなかった。PRL パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 PRL 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 区の消灯後の平均 PRL 濃度は急激に上昇し、消灯前の平均値に比べ、消灯後 1 時間から 2.25 時間までの値は有意に高かった ( $P<0.05$ )。8 : 16 L : D 区でも平均 PRL 濃度は消灯後上昇する傾向が見られた。

以上の結果から、光に対する GH 分泌反応は PRL のように明瞭ではないが、長日条件では昼と同様に夜間でも GH 分泌が亢進することが明らかになった。また PRL は消灯後 GH と異なり、急激に上昇することも明らかになった。

### 第3節 メラトニン (MEL) 処理における GH と PRL 分泌パターン

## 1. 緒 言

メラトニン (MEL) は松果体で合成され、松果体からパルス状に分泌される [9,29,51]。哺乳類において、日長情報は網膜から視交叉上核に伝えられ、上頸神経節を経由して、松果体に到達する [2,109]。松果体では、日長情報が MEL に変換されるが、特に暗期の長さが MEL の分泌量になって反映される [2,110]。ウシにおいても他の動物種と同様に MEL 分泌は昼間に低く、夜間に高いサーカディアンリズムを示す [9,51]。この MEL の分泌パターンは日長のシグナルを生体に知らせる重要な要因の一つであることが分かっている [2]。ヒツジとヤギでは日長の長さ、つまり MEL の分泌量の大小によって繁殖活動が制御されている [121]。

MEL の分泌パターンは様々なホルモンの分泌に影響を及ぼし、それらの内分泌変化は成長、繁殖及び泌乳に影響を及ぼす [24,63]。MEL は下垂体前葉及び後葉ホルモンの分泌を調節している [63]。ヒトでは午後遅く、MEL を経口投与すると、MEL の内因的なリズムを早める [63]。

MEL の投与により日長変化を人為的に調節できることが報告されている。長日条件は短日条件に比べ乳腺の実質組織を増加させ脂肪の蓄積を制限するが、長日期に MEL を与えることで短日期と同じような乳腺の成長と脂肪の蓄積を引き起こすことができる [24]。人工照明環境下で飼養しているウシでは消灯後の GH 濃度の上昇は MEL 濃度の上昇と平行することが報告されている [60]。また MEL の第三脳室内投与はウシの GH 分泌を刺激することも最近報告された [58]。これらことは、MEL が GH 分泌に深く関わっていることを示唆する。

第 1 節及び第 2 節では、日長変化が GH 及び PRL 分泌に影響を及ぼすことを明らかにした。本章では、16 : 8 L : D の日長条件下で MEL 処理した時のヤギの GH 及び PRL 分泌特性を調べた。

## 2. 材料及び方法

### 1) 供試動物

供試動物は家畜繁殖学研究室飼養の5～6歳の雌シバヤギ5頭(#11、#13、#14、#22、#23)であった。生理食塩水(生食)処理及びMEL処理実験開始時のヤギの体重は、それぞれ19.0～32.0 kg ( $28 \pm 2.4$  kg) 及び18.0～31.5 kg ( $27.7 \pm 2.7$  kg) であった。

実験期間中ヤギは、日長、温度及び湿度を制御できる環境制御室内で1頭ずつペンに入れ飼養し、朝8:00-9:00間に1回サイレージと濃厚飼料を十分量の水と共に給餌した。3週間ずつ同一環境内で飼養し、それぞれの環境に十分馴致させたのち、実験を行った。水は実験期間中自由に飲水させた。

### 2) 環境設定

実験期間中に設定した照明、温度、湿度及び照度はそれぞれ16時間明期(08:00-24:00):8時間暗期(24:00-08:00)(16:8L:D)、20°C、60%及び900ルクスであった。

### 3) 処理期間及び方法

16:00と20:00の2回、対照区として生理食塩水0.5 mlを40日間経口投与した。引き続きMEL(4 mg/頭)を16:00と20:00の2回40日間経口投与した。MELは粉末状のもの(和光純薬工業)を用い、当日に、4 mg/80 µlになるよう50°Cに加温したエタノールを用いて溶解し、生理食塩水で0.5 mlになるように希釈し、37°Cに保存した。

### 4) カテーテルの取り付け

第1節の実験で記述した方法に従った。

### 5) 試薬及び投与

第1節の実験で記述した方法に従った。

### 6) 採血方法

GH及びPRLの分泌パターンを調べた実験ではそれぞれの各処理条件下に12:00から16:00までの間(明期4時間)、15分間隔で計17回採血を行った。

GHRH 及び TRH の投与実験は 2 日間隔で行い、12:00 から 15:00 までの間 (明期 3 時間) に採血を行った。採血は 15 分間隔で計 13 回行い、GHRH 及び TRH の投与は採血開始 60 分後に行った。採血方法は第 1 節の実験で記述した方法に従った。

MEL 投与後の血漿中 MEL の濃度変化を調べた実験では 16:00、18:00、20:00、22:00 及び翌日 7:00 に採血を行った。

MEL における採血量は 1 回当たり 2 ml で、予め 30  $\mu$ l の 10% EDTA 溶液 (MQ 水に EDTA を 0.1 g/ml の割合で添加した液) を滴下しておいた 10 ml 試験管に入れ、実験終了まで 4°C で保存した。採血後は、ヘパリン溶液でカテーテル及びエキステンションチューブ内を満たした。採取した血液は 4°C において 3000 rpm で 30 分間遠心分離し、血漿を回収した。血漿はホルモン測定当日まで -30°C で保存した。

#### 7) ホルモン濃度の測定

##### (1) 血漿中 GH 濃度の測定

血漿中 GH 濃度の測定は第 1 節の実験で記述した方法に従った。すべての GH 試料は、二重測定を行った。アッセイは 1 回で行い、測定限界値は 0.1 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 5.0% であった。

##### (2) 血漿中 PRL 濃度の測定

血漿中 PRL 濃度の測定は第 1 節の実験で記述した方法に従った。すべての PRL 試料は、二重測定を行った。アッセイは 2 回で行い、測定限界値は 0.3 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 10% で、アッセイ間変動係数は 9% であった。

##### (3) 血漿中 MEL 濃度の測定

血漿中 MEL 濃度の測定は ELISA kit (IBL immuno biological laboratories、Hamburg、Germany) で行った。アッセイは 1 回で行い、測定限界値は 54.9 pg/ml で、アッセイ内変動係数は 4.0% であった。

#### 8) データ分析

GH 及び PRL のデータ分析は第 1 節の実験で記述した方法に従った。また、MEL 濃度の間の有意差は Two-way repeated measures ANOVA を用いて分散分析を行い、

Bonferroni 検定により各間における有意差を検定した。

### 3. 結果

#### 1) MEL 投与による血漿中 MEL 濃度の変化

4 mg の MEL を雌ヤギ 4 頭に経口投与した時の血漿 MEL 濃度の変化を Fig.9 に示す。MEL 経口投与後、血漿中 MEL の濃度は上昇した。MEL 経口投与後の血漿中 MEL 濃度は 18 : 00、20 : 00、22 : 00 で、対照区に比べ有意に高い値が得られた ( $P < 0.05$ )。

#### 2) 生食投与及び MEL 投与における明期 4 時間における GH パルス状分泌の変化

5 頭における血漿中 GH 濃度の変化は Fig.10 に示すとおりで、各個体とも GH はパルス状に分泌した。各個体の GH 性状は次のとおりであった。

# 11 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 4 回/4 h 及び 2 回/4 h、振幅は  $7.3 \pm 3.8$  ng/ml 及び  $1.6 \pm 0.9$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $5.7 \pm 1.5$  ng/ml 及び  $1.3 \pm 0.2$  ng/ml であった。

# 13 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 2 回/4 h 及び 3 回/4 h、振幅は  $2.0 \pm 1.5$  ng/ml 及び  $1.0 \pm 0.5$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.3 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml であった。

# 14 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 1 回/4 h 及び 3 回/4 h、振幅は  $4.0$  ng/ml 及び  $1.2 \pm 0.1$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.2 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $0.8 \pm 0.1$  ng/ml であった。

# 22 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 3 回/4 h 及び 4 回/4 h、振幅は  $0.9 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $1.1 \pm 0.7$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $0.9 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.7 \pm 0.2$  ng/ml であった。

# 23 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における GH パルスの頻度は 3 回/4 h 及び 3 回/4 h、振幅は  $8.7 \pm 2.8$  ng/ml 及び  $8.8 \pm 3.2$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $10.0 \pm 1.8$  ng/ml 及び  $7.3 \pm 1.1$  ng/ml であった。

生食投与区及び MEL 投与区における GH パルスの頻度、振幅及び平均 GH 濃度を 5 頭平均値で Table 5 に示す。生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における GH パルスの頻度は  $0.6 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.7 \pm 0.1$  回/h で有意差は見られなかった。GH パルス

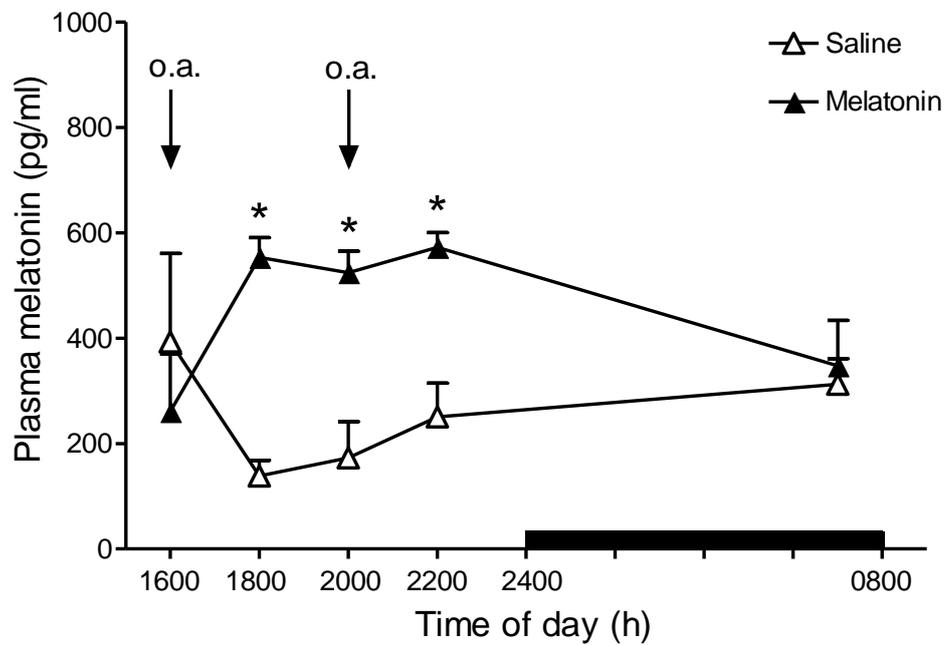


Fig. 9. Average plasma concentrations of melatonin after the oral administration (o.a.) of saline or melatonin (4 mg/head) in goats. The goats were orally administered saline or melatonin twice a day (16:00 and 20:00 hours). Arrows indicate the time of administration. The lighting condition and room temperature were kept at 16:8 L:D and 20°C, respectively. The dark period (24:00 to 08:00 hours) is shown by the black bar. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. \* $P$ <0.05 compared with the corresponding values from saline treatment.

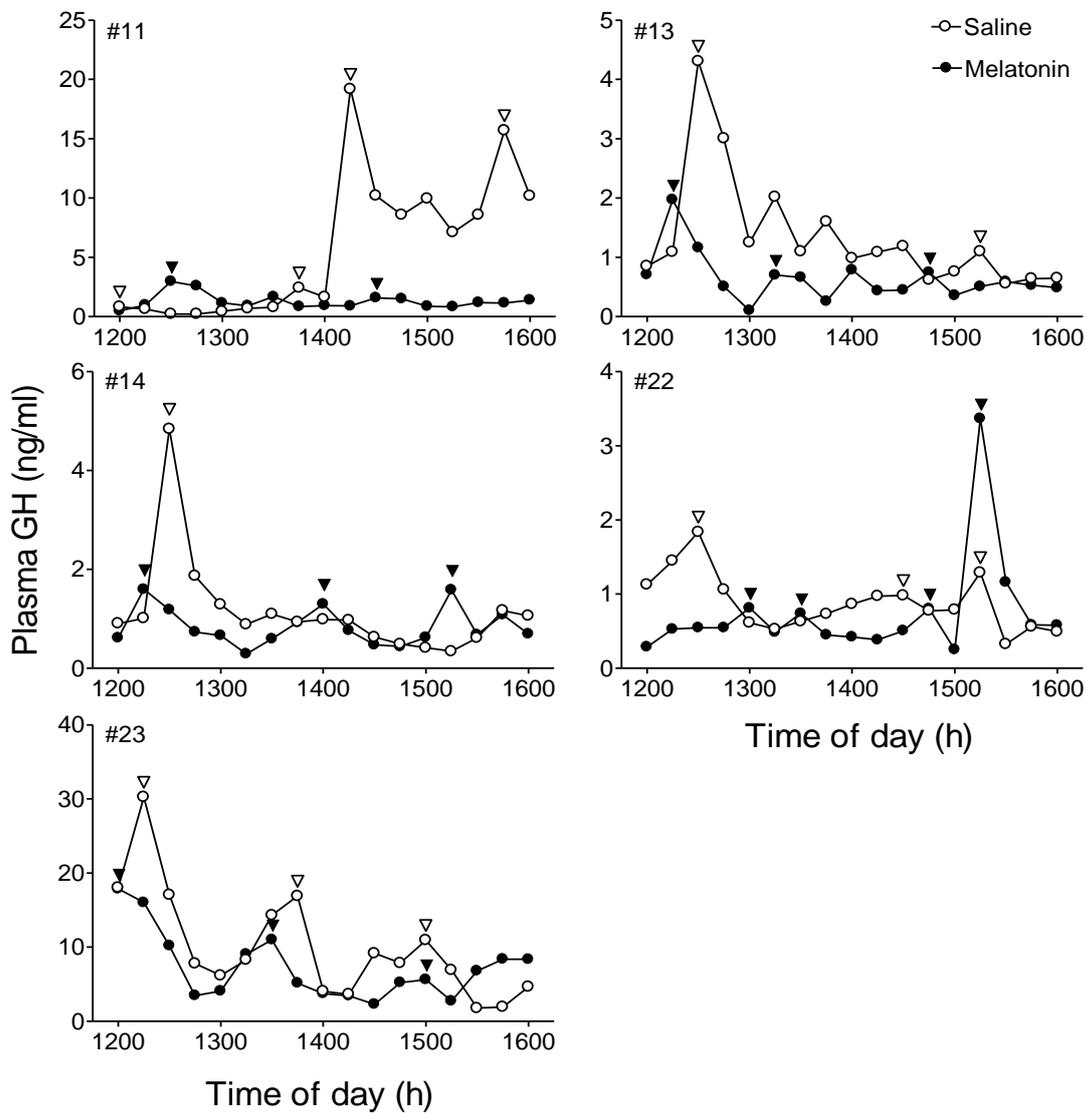


Fig. 10. Fluctuations in the plasma concentrations of GH for 4 h (12:00 to 16:00 hours) in saline- or melatonin-treated goats (#11, #13, #14, #22, #23). The goats were orally administered saline or melatonin twice a day (16:00 and 20:00 hours) for three weeks. The lighting condition and room temperature were kept at 16:8 L:D and 20°C, respectively. Triangles (▽ Saline; ▼ Melatonin) indicate GH pulses.

の振幅は  $6.8 \pm 2.0$  ng/ml 及び  $1.9 \pm 0.6$  ng/ml で、MEL 投与区は生食投与区に比べ有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、平均 GH 濃度は  $3.8 \pm 0.6$  ng/ml 及び  $2.2 \pm 0.4$  ng/ml で、MEL 投与区は生食投与区に比べ有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。

### 3) MEL 処理と GHRH による GH 放出反応

生食投与及び MEL 投与区における GHRH 投与後の血漿中 GH 濃度の変化を 5 頭の平均値で Fig.11 に示す。GHRH を投与すると生食投与区及び MEL 投与区とも、血漿中 GH 濃度は直ちに上昇し、投与後 15 分にピークが見られた。GH のピーク値は生食投与区及び MEL 投与区でそれぞれ  $42.0 \pm 13.8$  ng/ml 及び  $33.9 \pm 10.2$  ng/ml である。投与 30 分後の GH 濃度は、MEL 投与区は生食投与区に比べ有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

### 4) 生食投与及び MEL 投与における明期 4 時間における PRL パルス状分泌の変化

5 頭における血漿中 PRL 濃度の変化は Fig.12 に示すとおりであった。各個体の PRL パルス性状は次のとおりであった。

#11 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/4 h 及び 3 回/4 h、振幅は  $10.1$  ng/ml 及び  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $21.5 \pm 0.9$  ng/ml 及び  $0.9 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#13 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/4 h 及び 0 回/4 h、振幅は  $13.8$  ng/ml 及び  $0$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $17.2 \pm 1.4$  ng/ml 及び  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#14 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/4 h 及び 1 回/4 h、振幅は  $0$  ng/ml 及び  $0.4$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $21.8 \pm 0.8$  ng/ml 及び  $0.6 \pm 0.0$  ng/ml であった。

#22 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/4 h 及び 2 回/4 h、振幅は  $0$  ng/ml 及び  $0.9 \pm 0.4$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $20.0 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $1.2 \pm 0.1$  ng/ml であった。

**Table 5** Characteristics of GH pulses for 4 h (12:00 to 16:00 hours) after treatment with saline or melatonin

	Saline	Melatonin
Frequency (pulses/h)	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Amplitude (ng/ml)	6.8 ± 2.0 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.6 <sup>b</sup>
Mean GH (ng/ml)	3.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>b</sup>

The goats were orally administered saline or melatonin twice a day (16:00 and 20:00 hours) for three weeks. The lighting condition and room temperature were kept at 16:8 L:D and 20°C, respectively. Each value represents the mean ± SEM for five goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

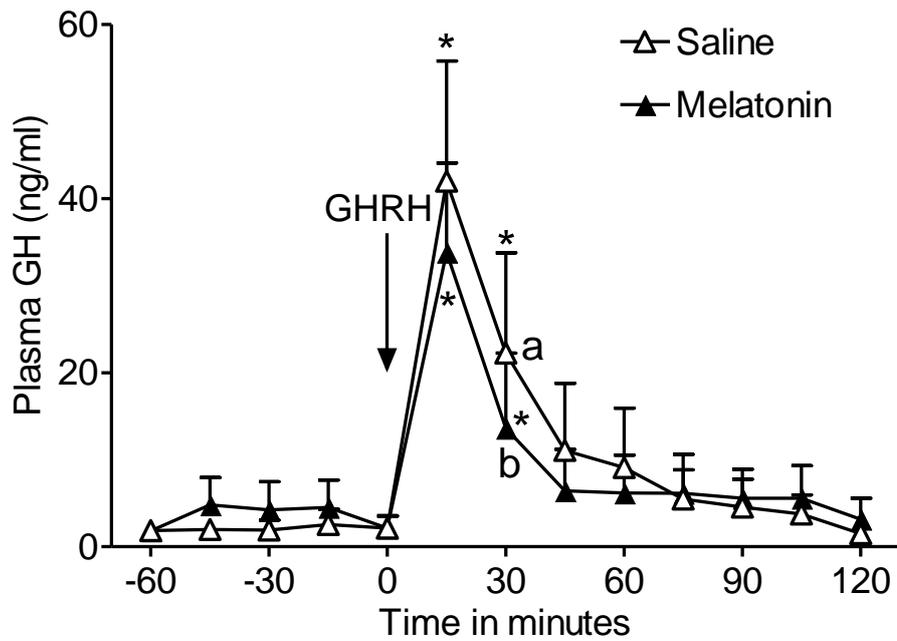


Fig. 11. Plasma concentrations of GH in response to i.v. injections of GHRH (0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) in saline- or melatonin- treated goats. The goats were orally administered saline or melatonin twice a day (16:00 and 20:00 hours) for three weeks. The lighting condition and room temperature were kept at 16:8 L:D and 20°C, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for five goats. \* $P < 0.05$  compared with the pre-injection values. The different letters (a, b) for each time denote significant differences ( $P < 0.05$ ).

#23 : 生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/4 h 及び 3 回/4 h、振幅は 0 ng/ml 及び  $0.5 \pm 0.1$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $20.9 \pm 0.6$  ng/ml 及び  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml であった。

生食投与区及び MEL 投与区における PRL パルスの頻度、振幅及び平均 PRL 濃度を 5 頭の平均値で Table 6 に示す。生食投与区及び MEL 投与区の明期 4 時間における PRL パルスの頻度はそれぞれ  $0.1 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.5 \pm 0.1$  回/h で、生食投与区に比べ MEL 投与区は高い傾向にあった ( $P=0.06$ )。PRL パルスの振幅はそれぞれ  $12.0 \pm 1.9$  ng/ml 及び  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml で、生食投与区に比べ MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、平均 PRL 濃度はそれぞれ  $20.3 \pm 1.8$  ng/ml 及び  $0.8 \pm 0.2$  ng/ml で、生食投与区に比べ MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。

#### 5) MEL 処理と TRH による PRL 放出反応

生食投与区及び MEL 投与区における TRH 投与後の血漿中 PRL 濃度の変化を 5 頭の平均値で Fig.13 に示す。TRH を投与すると生食投与区及び MEL 投与区とも、血漿中 PRL 濃度は投与 15 分後直ちに上昇した。投与 15 分後の PRL のピーク値はそれぞれ  $341.4 \pm 49.8$  ng/ml 及び  $23.1 \pm 4.7$  ng/ml であった。投与後 120 分間の PRL 濃度は生食投与区に比べ MEL 投与区は有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

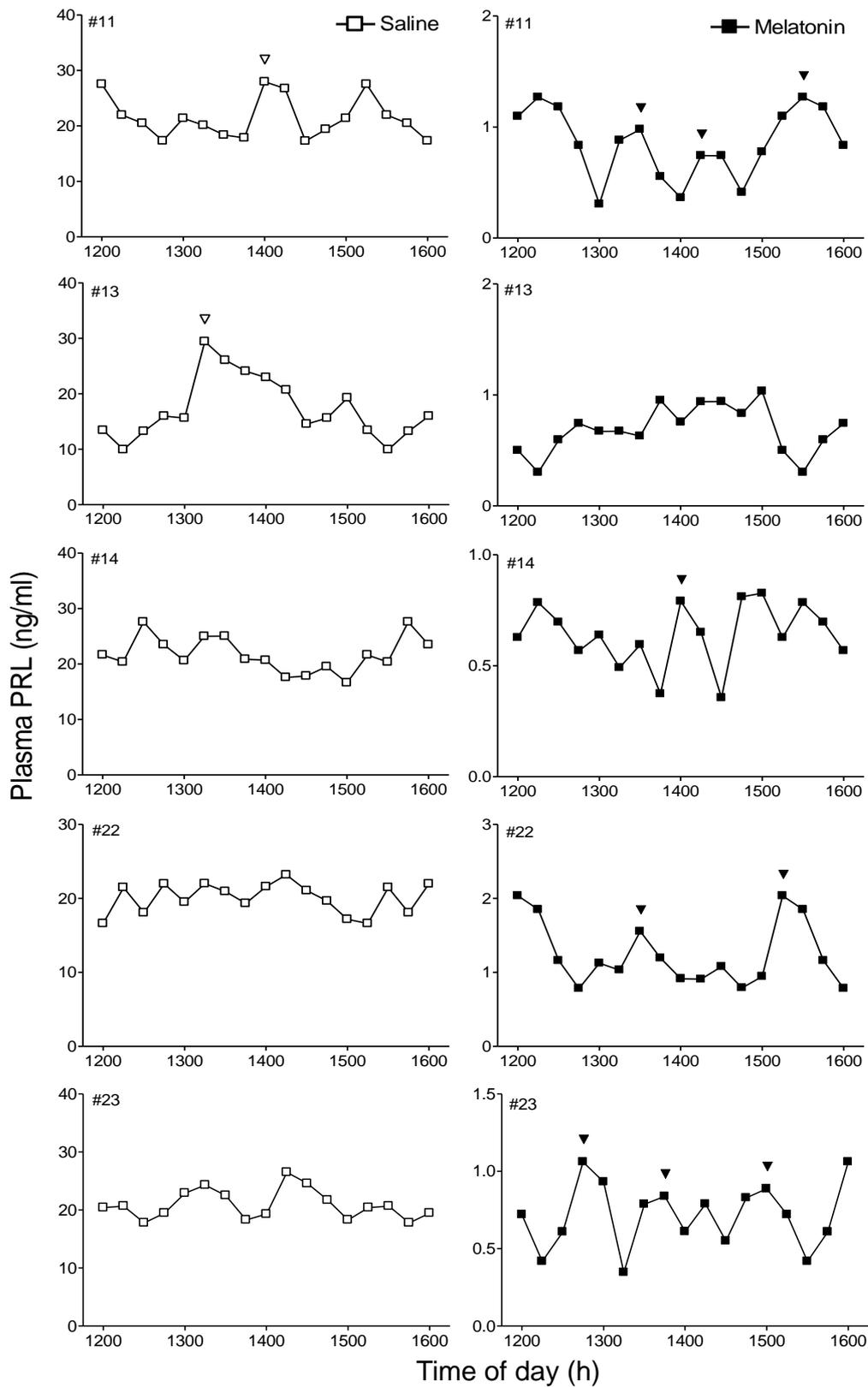


Fig. 12. Fluctuations in the plasma concentrations of PRL for 4 h (12:00 to 16:00 hours) in saline- or melatonin-treated goats (#11, #13, #14, #22, #23). The goats were orally administered saline or melatonin twice a day (16:00 and 20:00 hours) for three weeks. The lighting condition and room temperature were kept at 16:8 L:D and 20°C, respectively. Triangles (▽ Saline; ▼ Melatonin) indicate PRL pulses.

**Table 6** Characteristics of PRL pulses for 4 h (12:00 to 16:00 hours) after treatment with saline or melatonin

	Saline	Melatonin
Frequency (pulses/h)	0.1 ± 0.1 <sup>*</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>*</sup>
Amplitude (ng/ml)	12.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
Mean PRL (ng/ml)	20.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>

The goats were orally administered saline or melatonin twice a day (16:00 and 20:00 hours) for three weeks. The lighting condition and room temperature were kept at 16:8 L:D and 20°C, respectively. Each value represents the mean ± SEM for five goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ). \* $P = 0.06$

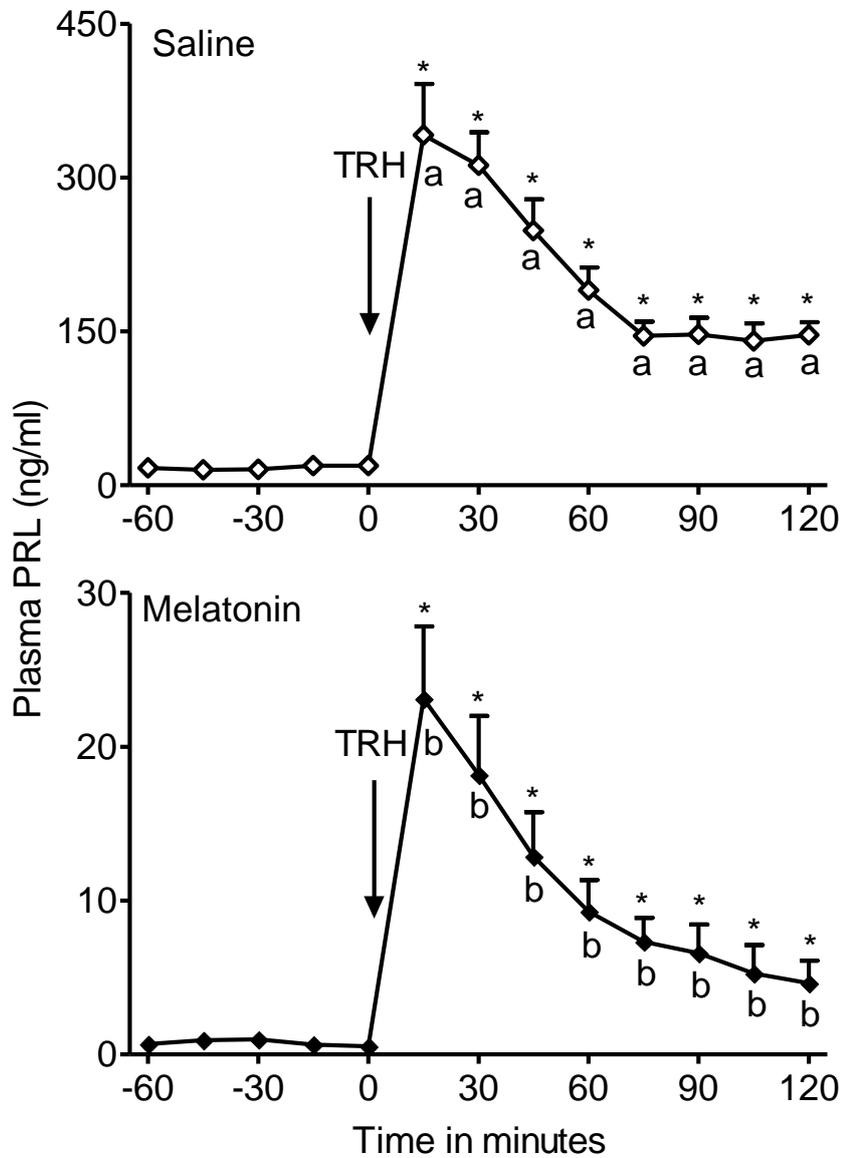


Fig. 13. Plasma concentrations of PRL in response to i.v. injections of TRH (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) in saline- or melatonin- treated goats. The goats were orally administered saline or melatonin twice a day (16:00 and 20:00 hours) for three weeks. The lighting condition and room temperature were kept at 16:8 L:D and 20°C, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for five goats. \* $P < 0.05$  compared with the pre-injection values. The different letters (a, b) for each time denote significant differences ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 考 察

MEL の経口投与により MEL 処理区は生理食塩水処理区に比べ、血中 MEL 濃度が有意に上昇した。MEL の経口投与により血中 MEL 濃度が上昇する結果はヒツジの報告と一致した [65]。また、ヒトでは午後遅く、MEL を経口投与すると、MEL の内因的なリズムを早めることが報告されている [63]。

明期における MEL 処理区では生理食塩水処理区と比べ、平均 GH 濃度及び平均 PRL 濃度とも有意に低い値を示した。また GH のパルスの振幅も低くなる傾向にあった。また、GH パルス頻度は変わらなかった。本研究の GH と PRL の変化は第 1 節の実験において日長を 16 : 8 L : D から 8 : 16 L : D に変化させたときの結果と類似していた。すなわち、MEL の経口投与によって短日期の生理状態に近くなったことが理解できた [2]。MEL 処理によりラットの視床下部の組織中のソマトスタチン分泌を刺激することが報告されている [101]。したがって、MEL がソマトスタチン分泌を刺激して GH 分泌を抑制したと考えられた。本節の実験から、光周期による GH 分泌特性の変化は MEL によって仲介されていることが示唆された。

MEL は雌ヒツジの PRL 分泌を調節することができる。すなわち、MEL の皮下移植や長期的な投与により PRL の分泌を抑えることができる [71,72,74,76]。明期における MEL 投与区では、生食投与区と比べ平均 PRL 濃度及び TRH による PRL 放出反応とも有意に低い値を示したことから、ヤギにおいても MEL の長期的な経口投与がヒツジと同様に PRL の分泌を効果的に調節できることが明らかになった。

MEL 経口投与は PRL の分泌に対する光周期の影響を中継することか示唆された。MEL の受容体はラクトトロフには存在しないが、下垂体隆起部に存在する [100,129]。視床下部—下垂体軸を切断されたヒツジにおいて、光周期や MEL 投与による PRL 分泌の変化が見られることから [73,74]、夜間に放出された MEL は末梢血液を介して下垂体隆起部に作用している可能性がある。MEL はラクトトロフへの直接作用はなく、間接的に作用して PRL の分泌に影響を与えているかもしれない。また、PRL 放出促進因子である TRH はラクトトロフ内の PRL の放出を促進するだけでなく、ラクトトロ

フ内の PRL の合成作用もある [132]。MEL は TRH により促進されるラクトロフの PRL 遺伝子発現を抑制することが報告されている [132]。MEL 処理によって TRH で促進される PRL 遺伝子の発現が抑制されたため、PRL 基礎濃度及び TRH で誘起される PRL 放出反応とも低くなったと考えられた。

本研究の結果から GH 及び PRL 共に、日長を 16L から 8L に変化させたときの結果と類似することが明らかになった。MEL 経口投与は GH、PRL の分泌に対する光周期の影響を中継すること、また MEL が日長の変化を介し GH、PRL の分泌に影響を与えていることが示唆された。

## 5. 要 約

本節では、MEL 処理に伴う雌ヤギの GH 及び PRL 分泌特性を明らかにしようとした。温度と日長をそれぞれ 20°C 及び 16 : 8 L : D に設定し、MEL 及び生理食塩水を 16 : 00 と 20 : 00 に 2 回経口投与し、MEL が GH 及び PRL 分泌に及ぼす影響を調べた。また、GHRH による GH 放出反応及び TRH による PRL 放出反応も合わせて検討した。

MEL 経口投与後、血漿中 MEL の濃度は有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。MEL 投与区及び生食投与区の GH パルスの頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。また平均 GH 濃度は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。さらに MEL 投与区及び生食投与区に GHRH を投与直後から 30 分までの GH 濃度は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低かった ( $P < 0.05$ )。PRL パルスの頻度には生食投与区に比べ MEL 投与区は高い傾向にあった ( $P = 0.06$ )。PRL パルスの振幅は生食投与区に比べ MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。また平均 PRL 濃度は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。さらに、MEL 投与区及び生食投与区の TRH 投与直後から 120 分までの PRL 濃度は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

以上の結果から、MEL で処理すると GH 及び PRL 共に、日長を 16L から 8L に変化させたときの結果と類似することが分かった。また MEL 処理による GH パルス振幅の減少に伴い GH 濃度が低くなること、GHRH による GH 分泌は MEL 処理により抑制されることが明らかになった。さらに、MEL 処理による PRL 分泌の低下は主に基礎濃度の減少によること、また TRH による PRL 分泌は MEL 処理により抑制されることも明らかになった。

### 第3章

日長が雄ヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響

## 1. 緒 言

性ステロイドホルモンは GH の分泌を修飾することが報告されている [39,84,120,133]。ラットでは雌雄により GH の分泌パターンに差がある。すなわち、雄のラットの標準的な GH の分泌パターンは 3-3.5 時間ごとに現れ、雌ではその間隔は雄より短く、不規則である [123]。また女性は男性のように規則的で大きな振幅をもつ GH パルスの出現は見られず、不規則で頻度の高い GH パルスが出現する [39]。さらに、雌ヤギにおいては、GH 分泌パターンは性ステロイドホルモンのレベルに応じて変化すること [133]、雄ヤギではアンドロジェンが GH 分泌パターンを修飾する可能性が報告されている [88]。これらの研究から、GH 分泌に及ぼす光周期の影響は雌雄により異なる可能性が考えられる。前章では、雌ヤギの GH はパルス状に分泌されること、また日長の変化は雌ヤギの GH 分泌パターンに影響を与えていることを明らかにした。そこで、本章では、雌の生殖生理機構と異なる雄ヤギを用いて GH の分泌に及ぼす日長の影響を調べた。

本章では前章の雌ヤギの実験と同様の条件下で日長を変化させた時の GH 分泌パターンを PRL の変化と共に検討した。また、本章では GHRH による GH 放出反応のほか、GHRH とは GH 放出機構が異なる GH 放出ペプチド (GHRP-2) の影響についても調べた。さらに、GH により肝臓から分泌されるインスリン様成長因子-1 (IGF-1) や性ステロイドであるテストステロン (T) 分泌の影響についても調べた。

## 2. 材料及び方法

### 1) 供試動物

供試動物は家畜繁殖学研究室飼養の1~2歳の雄シバヤギ4頭(#842、#844、#835、#836)であった。長日条件及び短日条件実験開始時のヤギの体重は、それぞれ11~22 kg ( $18.0 \pm 2.4$  kg) 及び26~14 kg ( $21.5 \pm 2.6$  kg) であった。また翌年に一部の反復実験を行った。この実験では2~3歳の雄シバヤギ4頭(#842、#844、#835、#837)を供試した。長日条件及び短日条件実験開始時のヤギの体重は、それぞれ15~26.5 kg ( $22.3 \pm 2.6$  kg) 及び20~28.6 kg ( $25.4 \pm 1.9$  kg) であった。

実験期間中ヤギは、日長、温度及び湿度を制御できる環境制御室内で1頭ずつペンに入れ飼養し、朝8:00-9:00間に1回サイレージと濃厚飼料を十分量の水と共に給餌した。3週間ずつ同一環境内で飼養し、それぞれ環境に十分馴致させたのち、実験を行った。水は実験期間中自由に飲水させた。

### 2) 環境設定

第2章第1節の実験で記述した方法に従った。

### 3) カテーテルの取り付け

第2章第1節の実験で記述した方法に従った。

### 4) 試薬及び投与

GHRH は、ヒトの GHRH (hGHRH (1-29)-NH<sub>2</sub> : ANASpec, Fremont, CA, USA) を用い、調製及び投与方法は第2章第1節の実験で記述した方法に従った。GHRP-2 (GHRP-2 human : GanWay, Nancy ridge drive, San Diego, CA, USA) の投与量は20 µg/kg b.w.であった。実験当日に生理食塩水で2 ml に希釈し、GHRH と同様方法に頸静脈内に投与した。TRH の投与は第2章第1節の実験で記述した方法に従った。

### 5) 採血方法

GH 及び PRL の分泌パターンを調べた実験では、それぞれの日長条件下の10:00から16:00まで(明期6時間)の間、15分間隔で計25回採血を行った。また、同様の血液採取を2日後にも行った。

IGF-1 及び T の分泌パターンを調べた実験では、それぞれの日長条件下の 12:00 から 16:00 まで (明期 4 時間) の間、1 時間間隔で計 5 回採血を行った。

GHRH、GHRP-2 及び TRH の投与実験は 2 日間隔で行い、12:00 から 15:00 まで (明期 3 時間) の間採血を行った。採血は 15 分間隔で計 13 回行い、GHRH、GHRP-2 及び TRH の投与は採血開始 60 分後に行った。

採血方法は第 2 章第 1 節の実験で記述した方法に従った。

## 6) ホルモン濃度の測定

### (1) 血漿中 GH 濃度の測定

血漿中の GH 濃度は第 2 章第 1 節の実験で記述した方法に従った。すべての試料は、二重測定を行った。アッセイは 2 回行い、測定限界値は 0.1 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 4.6% で、アッセイ間変動係数は 9.3% であった。

### (2) 血漿中 PRL 濃度の測定

血漿中の PRL 濃度は第 2 章第 1 節の実験で記述した方法に従った。すべての試料は、二重測定を行った。アッセイは 2 回行い、測定限界値は 0.2 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 12.5% で、アッセイ間変動係数は 7.5% であった。

### (3) 血漿中 IGF-1 の抽出及び測定

血漿中の IGF-1 結合蛋白を除去するために Daughaday らの方法 [25] に従い、血漿サンプルから酸-エタノール溶液を用いて IGF-1 を抽出した。血漿サンプル 0.1 ml と酸-エタノール溶液 (エタノール 87.5 ml と 2N HCl 12.5 ml の混合溶液) 0.9 ml をミキサーで攪拌後、室温で 30 分間インキュベーションした後、4°C 下において 3,000 rpm で 30 分間遠心分離を行った。次いで、上澄み液 0.5 ml に Tris buffer (Sigma Trizma base 0.855 M 溶液) 0.2 ml を加え中和させ、これを試料としてアッセイに用いた。

血漿中の IGF-1 濃度は、二抗体法を用いたエンザイムイムノアッセイ (以下 EIA) により測定した。第二抗体は抗ウサギ IgG 血清 (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) を用い、Coating buffer (0.01 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.03 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) で、1/600 に希釈して使用した。希釈後 100 µl/well ずつウェルに添加し、20°C 下で一晩インキュベーション

した。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、200  $\mu\text{l/well}$  の TBS-T (5 $\times$ TBS (Tris 12.1 g, NaCl 146.2 g を MQ 1 L に溶解、pH 7.5) 200 ml, 10% Tween 5 ml, MQ 水 795 ml) で 4 回洗浄した後、250  $\mu\text{l/well}$  の Blocking buffer (0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% BSA, pH 8.9) を添加し、20 $^\circ\text{C}$  下で一晩インキュベーションした。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、TBS-T で 4 回洗浄した。続いて、全てのウェルに Assay buffer (0.04 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, pH 7.2) を 150  $\mu\text{l/well}$  ずつ入れた後、Non-specific binding well (NSB) 以外の全てのウェルに第一抗体を 50  $\mu\text{l/well}$  添加した。NSB には Assay buffer を 50  $\mu\text{l/well}$  添加した。その後、20 $^\circ\text{C}$  下で一晩インキュベーションした。第一抗体には Anti-IGF-1 (National Hormone and Pituitary Program, Harbour-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA; A.F. Parlow 博士 提供) を 1/15,000 に希釈して使用した。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、TBS-T で 4 回洗浄後、Standard (STD) を 100  $\mu\text{l/well}$  で添加し、サンプルを 10  $\mu\text{l/well}$  ずつ添加した。またサンプルを添加したウェルに Assay buffer を 90  $\mu\text{l/well}$  添加した。ただし、NSB、B0 (STD0) には Assay buffer のみを 100  $\mu\text{l/well}$  添加した。1/30,000 に希釈した HRP-IGF-1 (Peroxidase Labeling kit、同仁化学研究所、熊本) を全てのウェルに 100  $\mu\text{l/well}$  添加し、軽く振盪した後、4 $^\circ\text{C}$  下で 4 時間インキュベーションした。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、TBS-T で 4 回洗浄した後、Substrate buffer (50 mM 酢酸ナトリウム (無水) 1 ml, o-フェニレンジアミン 40 mg,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3.3  $\mu\text{l}$ , MQ 水 9 ml) を全てのウェルに 100  $\mu\text{l/well}$  添加し 37 $^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、2 M の  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を全てのウェルに 100  $\mu\text{l/well}$  添加し反応を停止させた後、プレートリーダー (2030 ARVOTMX4 Perkin Elmer, Japan) で吸光度 (490 nm) を測定した。アッセイは 1 回行い、測定限界値は 0.08 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 9.2%であった。

#### (4) 血漿中 T の抽出及び測定

血漿サンプル 200  $\mu\text{l}$  を入れたカルチャーチューブにジエチルエーテル (関東化学株式会社) を約 2 ml 加え、30 秒間振盪した後、22 $^\circ\text{C}$  下において 2,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。遠心分離後、ドライアイスを入れたエタノールにチューブを浸し、血

漿層だけを急速凍結した。エーテル層を別のカルチャーチューブに移し、チューブヒーター (45°C) で温めながら N<sub>2</sub> ガスを送り乾固させた。乾固試料に Assay buffer を 200 µl 加え、約 30 秒間振盪した。これをステロイドホルモン測定用のサンプルとした。

血漿中の T 濃度は HRP で標識した T を用いた EIA により測定した [99]。第二抗体は、抗ヒツジ γ-グロブリンウサギ血清 (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) を用い、Coating buffer で 1/340 に希釈して使用した。第二抗体は希釈後 100 µl/well ずつ添加し、20°C 下で一晩インキュベーションした。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、TBS-T を用い、200 µl/well で 4 回洗浄した後、Blocking buffer を 250 µl/well 添加し、20°C 下で一晩インキュベーションした。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、TBS-T で 4 回洗浄した。続いて、全てのウェルに Assay buffer を 150 µl/well ずつ入れた後、NSB 以外の全てのウェルに第一抗体を 50 µl/well 添加した。NSB には Assay buffer を 50 µl/well 添加した。その後、20°C 下で一晩インキュベーションした。第一抗体には抗 T ヒツジ血清 (1-#250 anti-T-11-BSA serum, Niswender) を 1/30,000 に希釈して使用した。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、TBS-T で 4 回洗浄後、STD、サンプルを 25 µl/well 添加した。ただし、NSB、B0 (STD0) には Assay buffer のみを 25 µl/well 添加した。1/10,000 に希釈した HRP-T を全てのウェルに 100 µl/well 添加し、軽く振盪した後、4°C 下で 4 時間インキュベーションした。インキュベーション後、ウェル内の液を捨て、TBS-T で 4 回洗浄した後、Substrate buffer を全てのウェルに 100 µl/well 添加し 37°C で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、2 M の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を全てのウェルに 100 µl/well 添加し反応を停止させた後、プレートリーダー (2030 ARVOTMX4 Perkin Elmer, Japan) で吸光度 (490 nm) を測定した。アッセイは 1 回行い、測定限界は 0.04 ng/ml、アッセイ内変動は 8.2 %であった。

#### 7) データ分析

GH 及び PRL のデータ分析は第 2 章第 1 節の実験で記述した方法に従った。IGF-1 及び T 濃度の間の有意差は Two-way repeated measures ANOVA を用いて分散分析を行い、Bonferroni 検定により有意差を検定した。

### 3. 結果

#### 1) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GH パルス状分泌の変化

4頭で2回実験を反復した時の血漿中 GH 濃度の変化は Fig.14 に示すとおりである。

#844 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 5 回/6 h 及び 5 回/6 h、振幅は  $0.4 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.4 \pm 0$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $0.8 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.4 \pm 0$  ng/ml であった。

#842 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 2 回/6 h 及び 5 回/6 h、振幅は  $2.0 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $0.3 \pm 0.1$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.6 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.3 \pm 0$  ng/ml であった。

#835 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 4 回/6 h 及び 4 回/6 h、振幅は  $1.6 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $0.9 \pm 0.2$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $2.7 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $1.1 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#836 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 4 回/6 h 及び 5 回/6 h、振幅は  $2.6 \pm 1.0$  ng/ml 及び  $2.0 \pm 1.1$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.5 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#844' : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 4 回/6 h 及び 3 回/6 h、振幅は  $1.1 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.5 \pm 0.4$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.5 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#842' : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 3 回/6 h 及び 5 回/6 h、振幅は  $1.8 \pm 1.1$  ng/ml 及び  $0.5 \pm 0.1$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.9 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#835' : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 5 回/6 h 及び 5 回/6 h、振幅は  $0.7 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.9 \pm 0.3$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.4 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.9 \pm 0.1$  ng/ml であった。

#836' : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は 3 回/6 h 及び 4 回/6 h、振幅は  $2.0 \pm 1.1$  ng/ml 及び  $1.9 \pm 0.6$  ng/ml、平均 GH 濃度は  $1.9 \pm 0.2$  ng/ml

及び  $2.3 \pm 0.4$  ng/ml であった。

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GH パルスの頻度、振幅及び平均 GH 濃度を 4 頭 8 例の平均値で Table 7 に示す。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における GH パルスの頻度は、それぞれ  $0.7 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.7 \pm 0.1$  回/h で有意差は見られなかった。GH パルスの振幅は、それぞれ  $1.4 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.9 \pm 0.2$  ng/ml で、8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度は、それぞれ  $1.8 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.9 \pm 0.1$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。

#### 2) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GHRH による GH 放出反応

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GHRH 投与後の血漿中 GH 濃度の変化を 4 頭 6 例の平均値で Fig.15 に示す。GHRH を投与すると、16 : 8 L : D 区及び 8 : 16 L : D 区とも血漿中 GH 濃度は直ちに上昇し、投与後 15 分にピークが見られた。GH のピーク値は 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D でそれぞれ  $22.0 \pm 3.0$  ng/ml 及び  $12.0 \pm 2.0$  ng/ml で 16 : 8 L : D 区は 8 : 16 L : D 区に比べ有意に高かった ( $P<0.05$ )。

#### 3) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GHRP-2 による GH 放出反応

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における GHRP-2 投与後の血漿中 GH 濃度の変化を 4 頭 6 例の平均値で Fig.16 に示す。GHRP-2 を投与すると、16 : 8 L : D 区及び 8 : 16 L : D 区とも血漿中 GH 濃度は直ちに上昇し、それぞれ投与 30 分及び 15 分をピークとする一過性の放出が見られた。GH のピーク値は 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D でそれぞれ  $23.2 \pm 3.5$  ng/ml 及び  $20.8 \pm 3.8$  ng/ml で、両区に有意差は見られなかった。

#### 4) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における PRL パルス状分泌の変化

4 頭の第 1 回目及び第 2 回目の実験における血漿中 PRL 濃度の変化はそれぞれ Fig.17 及び Fig.18 に示すとおりであった。

#844 : 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/6 h 及び 2 回/6 h、振幅は 0 ng/ml 及び  $0.3 \pm 0.1$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $5.3 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $0.3 \pm 0.1$  ng/ml であった。

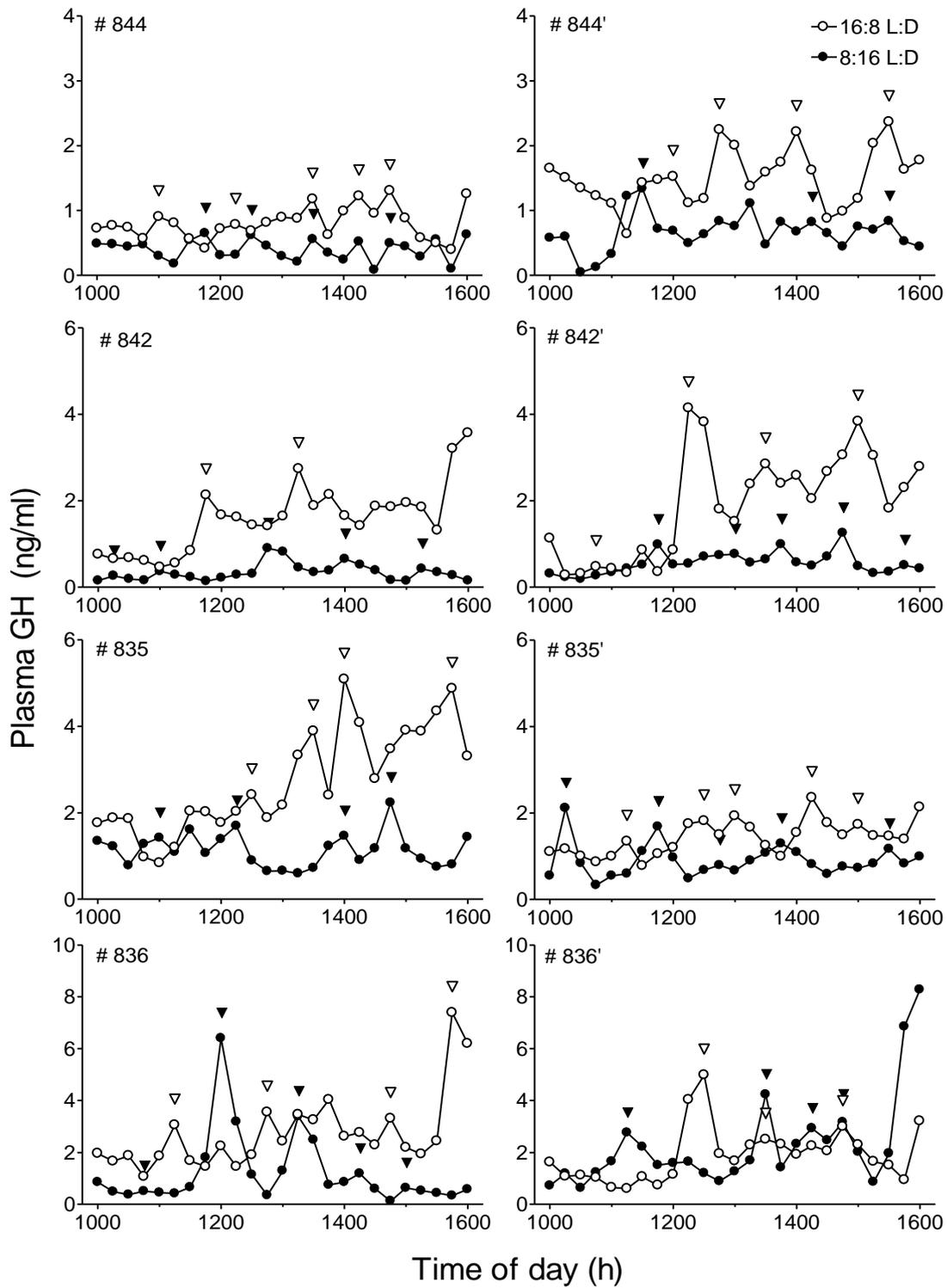


Fig. 14. Fluctuations in the plasma concentrations of GH for 6 h (10:00 to 16:00 hours) in four individual goats (#844, #842, #835, #836). Experiments were performed twice, and the second blood samplings (#844', #842', #835', #836') were performed 3 days after the first (#844, #842, #835, #836). Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Triangles (▽ 16:8 L:D ; ▼ 8:16 L:D) indicate GH pulses.

**Table 7** Characteristics of GH pulses for 6 h (10:00 to 16:00 hours)

	16:8 L:D	8:16 L:D
Frequency (pulses/h)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Amplitude (ng/ml)	1.4 ± 0.2*	0.9 ± 0.2*
Mean GH (ng/ml)	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>b</sup>

Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. The room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean ± SEM for eight experiments from four goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ). \* $P = 0.1$

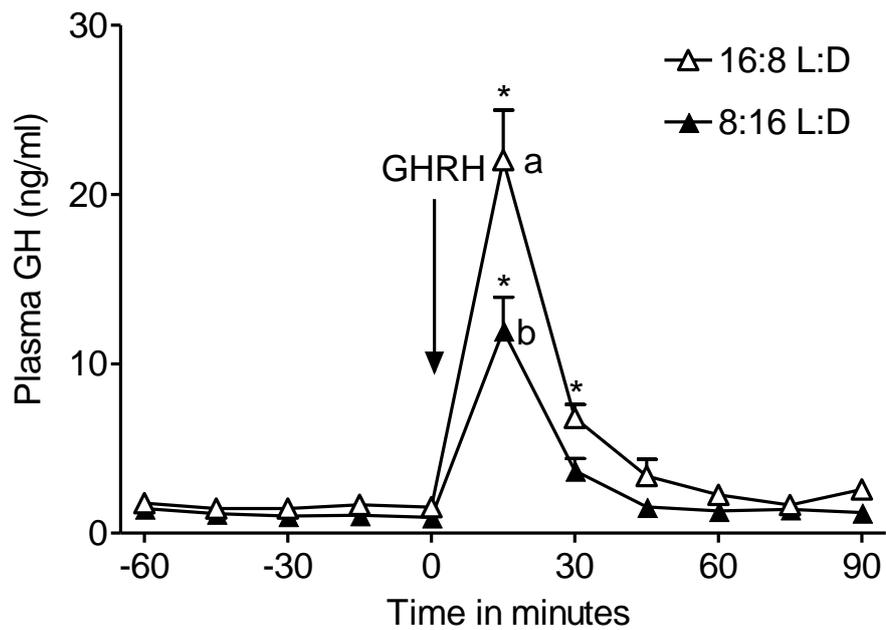


Fig. 15. Plasma concentrations of GH in response to i.v. injections of GHRH (0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) in the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for six experiments from four goats. \* $P < 0.05$  compared with the pre-injection values. The different letters (a, b) for each time denote significant differences ( $P < 0.05$ ).

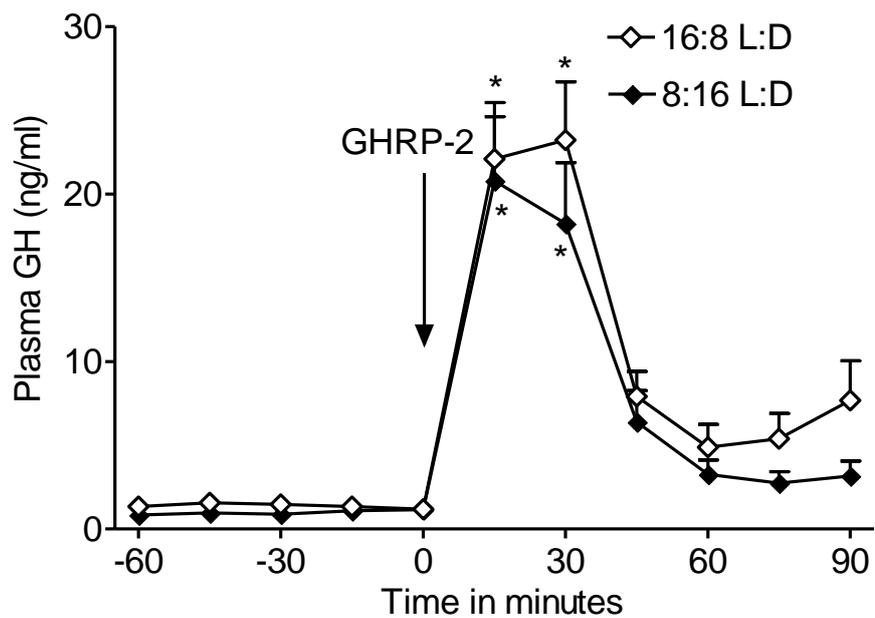


Fig. 16. Plasma concentrations of GH in response to i.v. injections of GH-releasing peptide (GHRP-2, 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) in the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for six experiments from four goats. \* $P < 0.05$  compared with the pre-injection values.

#842: 16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 0 回/6 h 及び 1 回/6 h、振幅は 0 ng/ml 及び  $0.3 \pm 0$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $2.4 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml 及びであった。

#835: 16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 3 回/6 h 及び 1 回/6 h、振幅は  $2.2 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $4.2 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml であった。

#836: 16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 2 回/6 h 及び 2 回/6 h、振幅は  $2.5 \pm 0.8$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0.1$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $1.0 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml であった。

#844': 16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/6 h 及び 0 回/6 h、振幅は  $4.7 \pm 0$  ng/ml 及び 0 ng/ml、平均 PRL 濃度は  $5.6 \pm 0.4$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml であった。

#842': 16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/6 h 及び 3 回/6 h、振幅は  $1.7 \pm 0$  ng/ml 及び  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml、平均 PRL 濃度は  $2.8 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.3 \pm 0$  ng/ml であった。

#835': 16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 1 回/6 h 及び 0 回/6 h、振幅は  $2.4 \pm 0$  ng/ml 及び 0 ng/ml、平均 PRL 濃度は  $3.5 \pm 0.3$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml であった。

#836': 16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は 2 回/6 h 及び 0 回/6 h、振幅は  $0.6 \pm 0.2$  ng/ml 及び 0 ng/ml、平均 PRL 濃度は  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml であった。

16:8L:D 及び 8:16L:D におけるの PRL パルスの頻度、振幅及び平均 PRL 濃度を 4 頭 8 例の平均値で Table 8 に示す。16:8L:D 及び 8:16L:D の 6 時間における PRL パルスの頻度は、それぞれ  $0.2 \pm 0.1$  回/h 及び  $0.2 \pm 0.1$  回/h で有意差は見られなかった。PRL パルスの振幅は、それぞれ  $2.2 \pm 0.4$  ng/ml 及び  $0.4 \pm 0.1$  ng/ml で、8:16L:D 区に比べ 16:8L:D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、16:8L:D 及び

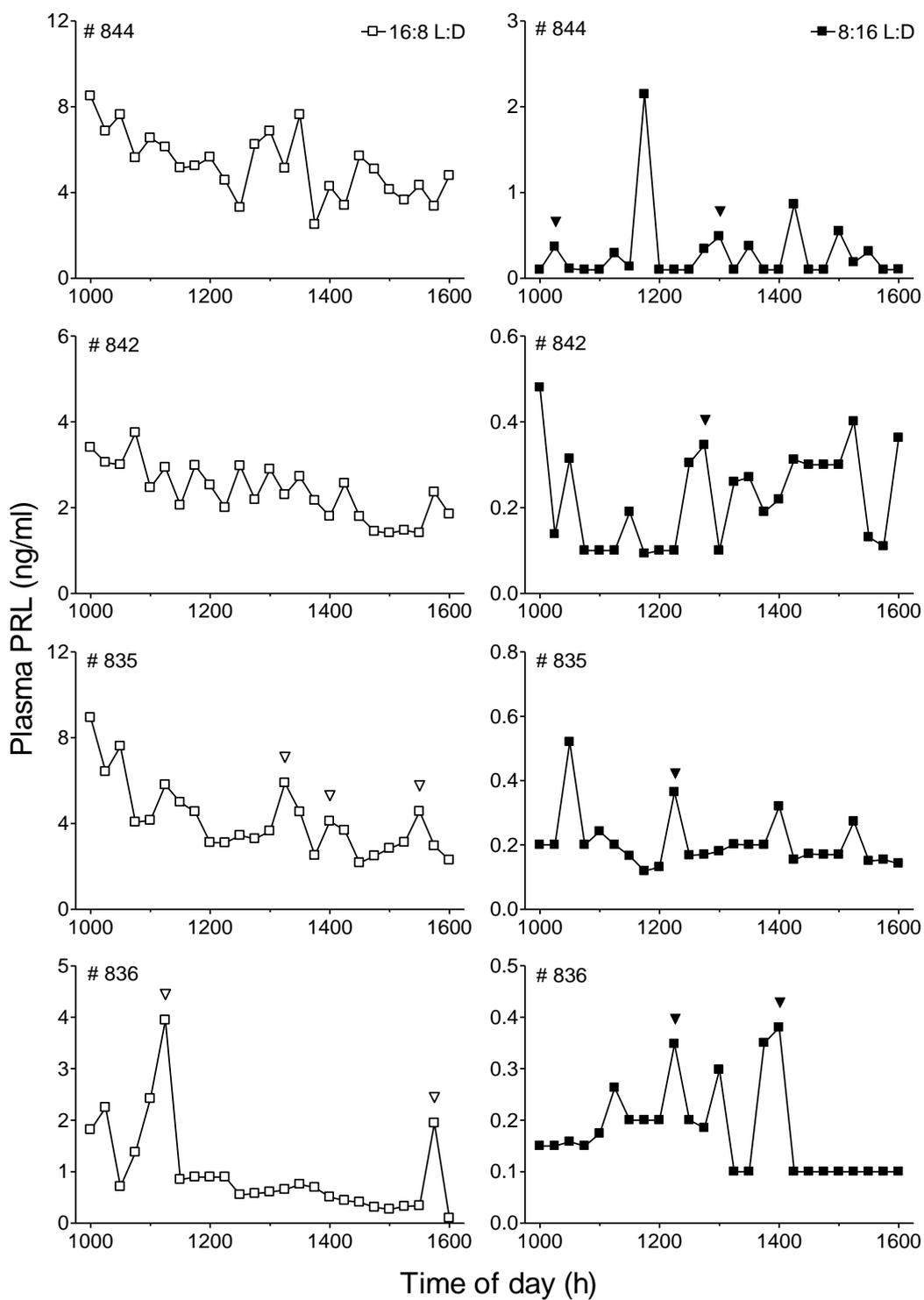


Fig. 17. Fluctuations in the plasma concentrations of PRL for 6 h (10:00 to 16:00 hours) in four individual goats (#844, #842, #835, #836). Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Triangles (▽ 16:8 L:D; ▼ 8:16 L:D) indicate PRL pulses.

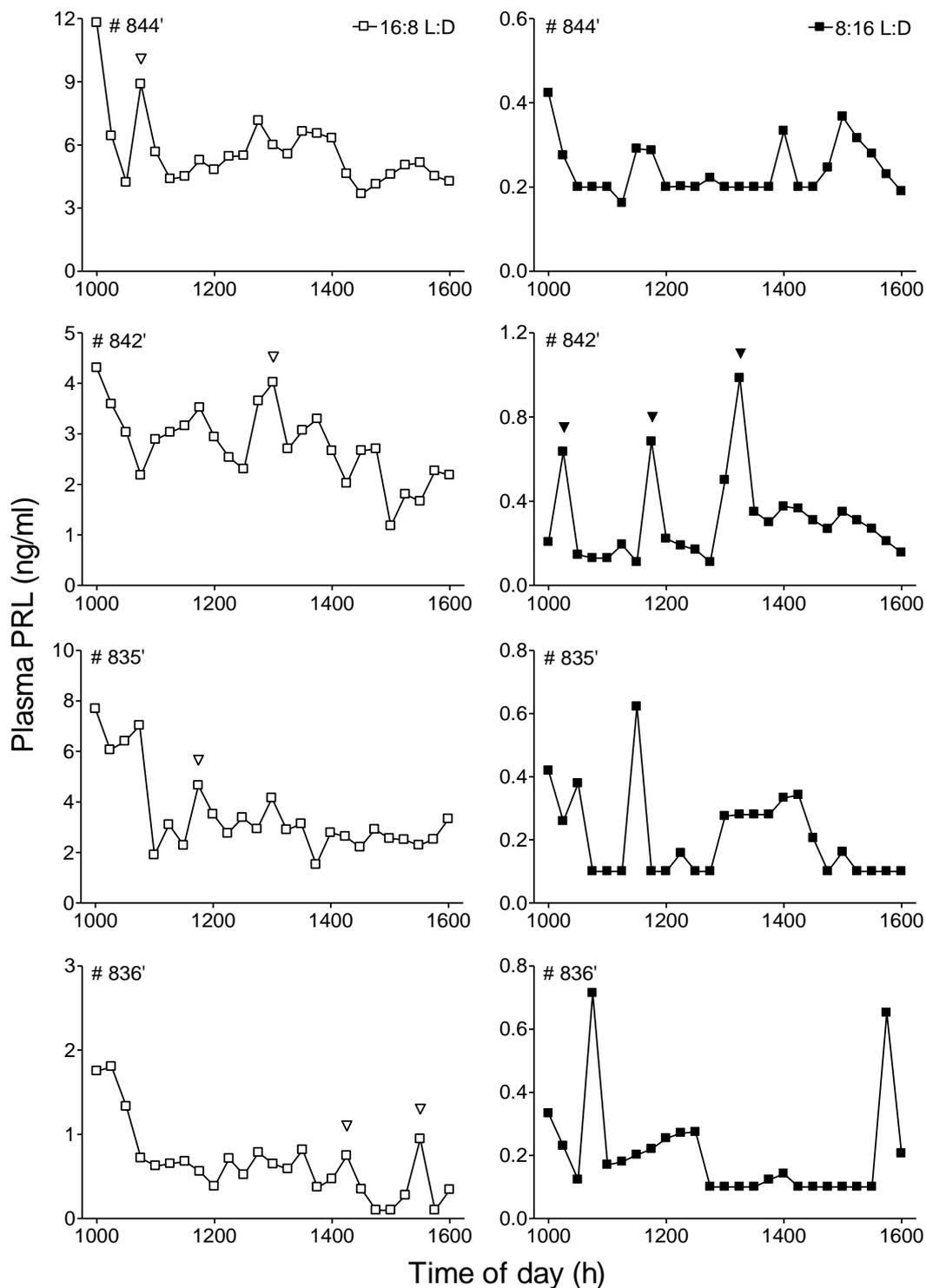


Fig. 18. Fluctuations in the plasma concentrations of PRL for 6 h (10:00 to 16:00 hours) in four individual goats (#844, #842, #835, #836). Experiments were performed twice, and the second blood samplings (#844', #842', #835', #836') were performed 3 days after the first (#844, #842, #835 and #836 in the Fig. 17). Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Triangles ( $\nabla$  16:8 L:D;  $\blacktriangledown$  8:16 L:D) indicate PRL pulses.

8 : 16 L : D における平均 PRL 濃度は、それぞれ  $3.2 \pm 0.2$  ng/ml 及び  $0.2 \pm 0$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

5) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における TRH による PRL 放出反応

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の TRH 投与後の血漿中 PRL 濃度の変化を 5 頭の平均値で Fig.19 に示す。TRH を投与すると、16 : 8 L : D 区及び 8 : 16 L : D 区とも血漿中 PRL 濃度は投与 15 分後直ちに上昇した。16 : 8 L : D 区投与 30 分後及び 8 : 16 L : D 区投与 15 分後 PRL のピーク値は、それぞれ  $543.3 \pm 99.8$  ng/ml 及び  $3.6 \pm 0.9$  ng/ml であった。投与後 120 分間の PRL 濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

6) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における血漿中 IGF-1 濃度の変化

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の血漿中 IGF-1 濃度の変化を 4 頭の平均値で Fig.20 に示す。また、16 : 8 L : D の採血開始 2、3 及び 5 時間の IGF-1 濃度は 8 : 16 L : D の値に比べ有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 IGF-1 濃度は、それぞれ  $142.3 \pm 11.6$  ng/ml 及び  $107.0 \pm 10.4$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

7) 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における血漿中 T 濃度の変化

16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の血漿中 T 濃度の変化を 4 頭の平均値で Fig.21 に示す。16 : 8 L : D の採血開始 1、2、3 及び 4 時間の T 濃度は 8 : 16 L : D の値に比べ有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。また 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 T 濃度は、それぞれ  $1.5 \pm 0.5$  ng/ml 及び  $8.5 \pm 0.7$  ng/ml で、8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

**Table 8** Characteristics of PRL pulses for 6 h (10:00 to 16:00 hours)

	16:8 L:D	8:16 L:D
Frequency (pulses/h)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Amplitude (ng/ml)	2.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>
Mean PRL (ng/ml)	3.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>

Goats were kept under the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. The room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean ± SEM for eight experiments from four goats. Values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

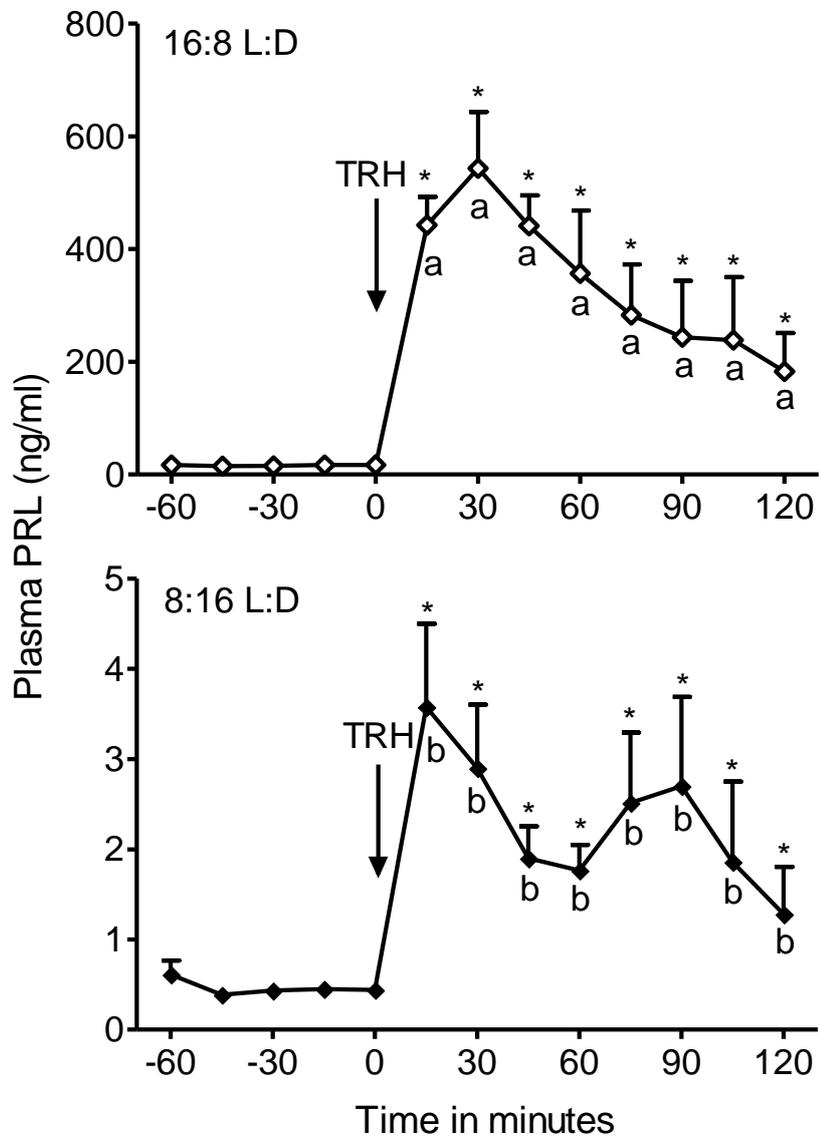


Fig. 19. Plasma concentrations of PRL in response to i.v. injections of TRH (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) in the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. \* $P < 0.05$  compared with the pre-injection values. The different letters (a, b) for each time denote significant differences ( $P < 0.05$ ).

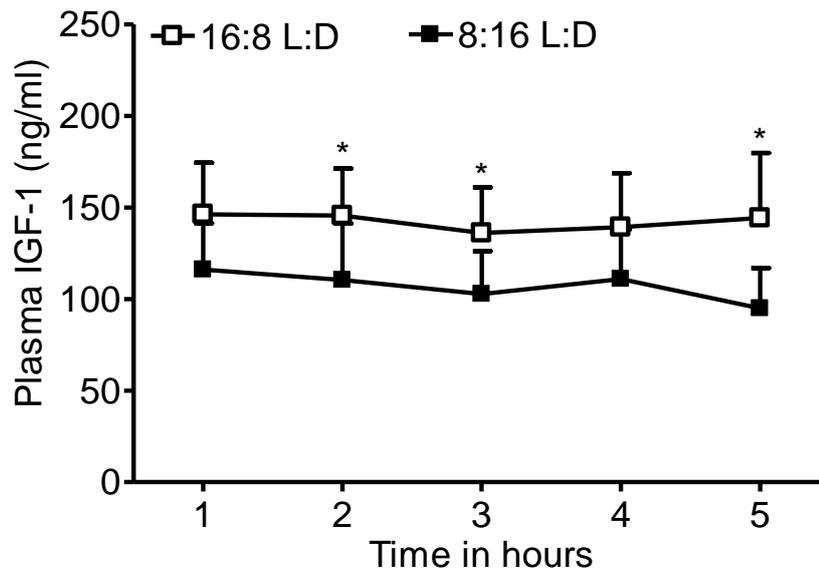


Fig. 20. Average plasma concentrations of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) for 4 h (11:00 to 15:00 hours) in the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. \* $P < 0.05$  compared with the 8:16 L:D group.

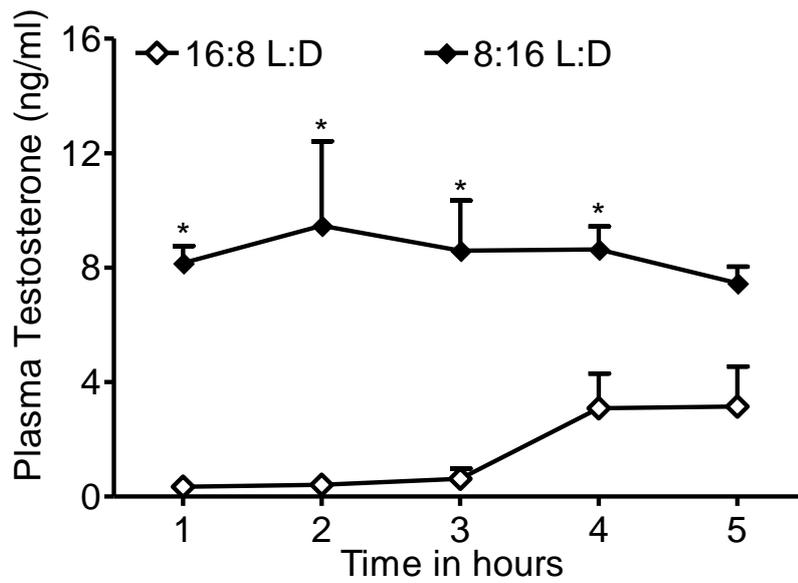


Fig. 21. Average plasma concentrations of testosterone (T) for 4 h (11:00 to 15:00 hours) in the 16:8 L:D or 8:16 L:D photoperiods. Room temperature was kept at 20°C. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. \* $P$ <0.05 compared with the 16:8 L:D group.

#### 4. 考 察

本研究は雄ヤギの GH 分泌形態に及ぼす日長の影響を明らかにしようとした。その結果、雄ヤギの GH 分泌は雌と同様日長により修飾され、GH 分泌は日長が長くなると高まることが明らかになった。また、血漿中の PRL 及び IGF-1 濃度は日長時間の延長により高くなるが、血漿中 T 濃度は日長時間の延長により低くなることも明らかになった。

雄ヤギの GH はパルス状に分泌され、パルスは大きいパルスと小さなパルスから構成されていることが示された。本結果は第 2 章の雌ヤギにおける結果、未經産牛 [96]、去勢牛 [128] 及び泌乳牛 [90] における研究から得られた結果と類似していた。一方、ホルスタイン種去勢牛においては GH 濃度のピークは、ほぼ等間隔に 1 日当たり 4 回現われること [59]、また雄ヤギ及び去勢ヤギでは約 6 時間間隔で大きい振幅の GH 分泌パターンが見られることが報告されているが [88]、本研究ではこのような規則的な分泌パターンは見られなかった。この差は雌の実験と同様に飼育環境の違いによるものかもしれない。すなわち、これらの実験では 12 : 12 L : D 日長条件下で行われていた。また、牛における実験について、エサは 08 : 30 および 15 : 30 時間で 1 日に 2 回に与え、水は自由に飲水させていた [59]。規則的な分泌パターンが観察された雌と雄ヤギの実験では、エサは自由に採取させ、水も自由飲水させていた [88,133]。本研究は日長、給餌時間、年齢及び供試動物がこれらの研究と異なっていた。どの要因が反芻家畜の周期的な GH パルス分泌パターンに影響するのか不明である。しかし、実験に使用される動物間に GH 分泌パターンを形成する内生性の生体リズムに関する遺伝的な特徴差が存在する可能性も考えられる。

8 : 16 L : D に比べ、16 : 8 L : D の平均 GH 濃度は有意に高かった。8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 下の GH パルスの振幅は高い傾向が見られ、大きな GH パルスが 16 : 8 L : D 下に現われた。これらの結果は第 2 章雌ヤギの結果と一致した。また、ヒツジ [36] やヤギ [51] の結果と符合した。

GHRH 投与による GH 放出反応は、16 : 8 L : D では 8 : 16 L : D に比べ持続的な GH

分泌パターンを示し、第2章の雌ヤギの結果と一致した。日長変化が雄ヤギの GHRH による GH 放出に影響することが示されたが、GHRP-2 による GH 放出反応には有意な差は見られなかった。GHRP は GHRH と異なるシグナル伝達機構により GH を放出させる。すなわち、GHRH は GHRH 受容体を介し、cAMP を増加させ GH を分泌させるのに対し、GHRP は GHS 受容体を介し、プロテインキナーゼ C を活性化して GH を分泌させる [20]。このように、GHRH と GHRP-2 の GH 放出機構は異なるので、GHRH と GHRP-2 により誘起される GH 放出反応に対する日長の影響も異なっていたと推察された。

本研究において、8 : 16 L : D に比べ、16 : 8 L : D の平均 PRL 濃度は極めて高かった。この結果も第2章の雌ヤギにおける結果と一致した。日長の PRL 分泌への影響は視床下部一下垂体軸を介して作用することが分かっている [23,81]、本研究の GH 分泌への影響も日長が視床下部一下垂体軸を介して行われていることが示唆される。日長が視床下部一下垂体軸によって反芻家畜の PRL と GH 分泌に及ぼすメカニズムはまだ明らかにされていないが、第2章の実験からメラトニンがこのメカニズムに関係していることが推察される。

日長変化による血漿中 IGF-1 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D は高かった。ウシにおいて血漿中 IGF-1 濃度は GH 濃度に依存し増加する。したがって、本実験では長日期に増加した GH 分泌が同時期の IGF-1 濃度を増加させたことが示唆された。ヒツジ [107]、子ウシ [98] 及びヤギ [126] の成長は日長により影響を受けることが報告されているが、長日条件によって GH 及び IGF-1 濃度が増加した本研究の結果はこれらの報告の一つ裏付となろう。

血漿中の T 濃度は GH、PRL、IGF-1 と異なり、16 : 8 L : D に比べ 8 : 16 L : D は高い濃度を示した。短日期に雄ヒツジと雄シカでは T 濃度の増加に伴い高い精巣重量を維持したことが報告されており、本実験の T 濃度の結果が支持された [19]。一方、GH 濃度は 8 : 16 L : D より 16 : 8 L : D が高かった。この結果は、短日条件は T 濃度を増加させたが、GH 濃度を減少させたとの雄ヤギ [36] 及び雄ヒツジ [75] における結果と一致

した。精巣から分泌されるアンドロジェンは雄ヤギのGH分泌パターンに影響を与えることが示唆されており、春機発動後のヤギは去勢によってGHパルスの振幅が増加する [88]。Tは視床下部のGHRH及びSSニューロンに働きGH分泌に影響しているかもしれない [21]。しかし、本章の雄GHにおける結果は第2章の雌における結果と同様のため、短日条件下で増加したTがGHの分泌パターンに直接影響を与えたかどうかは明らかでない。ラット [54,114,120] 及びヒト [111,119,120] では雌雄によりGHの分泌パターンに明瞭な差があるが、本研究の結果をこれらの結果と直接比較することは難しい。しかしながら、雌ヤギの平均GH濃度及びGHパルスの振幅は、雄ヤギに比べ高いことが観察された。また、本研究の結果から長日条件は性差にかかわらずGHの分泌を亢進することが分かった。

以上本章の実験から、日長を延長させると雄ヤギのT分泌は低下するが、GH、PRL、IGF-1分泌は亢進することが明らかになった。またGHの亢進は主にパルス振幅の増加に伴うGH濃度の上昇に起因し、雄ヤギのGH分泌は雌と同様に日長により影響されることが分かった。さらにGHRHによるGH分泌は日長の延長により高まるが、GHRP-2ではその影響が少ないことも分かった。

## 5. 要 約

本章では、日長の変化に伴う明期の雄ヤギの GH 及び PRL 分泌特性を調べた。また、GHRH 及び GHRP-2 による GH 放出反応及び TRH による PRL 放出反応も合わせて検討した。さらに、日長変化に伴う明期の雄ヤギの IGF-1 及び T 濃度の変化も調べた。実験は温度を 20°C に設定し、日長を 8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に変化させ行った。

8 : 16 L : D 区及び 16 : 8 L : D 区の GH パルスの頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。さらに、8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に GHRH で投与した結果、GH のピーク濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D における GHRP-2 による GH の放出反応には有意な変化は見られなかった。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の PRL パルス頻度には有意な変化は見られなかった。PRL パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。また、16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 PRL 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。さらに、8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に THR を投与した結果、投与直後から 120 分までの PRL 濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 IGF-1 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 T 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に低かった ( $P<0.05$ )。

以上の結果から日長を延長させると雄ヤギの T 分泌は低下するが、GH、PRL、IGF-1 分泌は亢進することが明らかになった。また GH の亢進は主にパルス振幅の増加に伴う GH 濃度の上昇に起因し、雄ヤギの GH 分泌は雌と同様に日長により影響されることが分かった。また GHRH による GH 分泌は日長の延長により高まるが、GHRP-2 ではその影響が少ないことも分かった。

## 第4章

視床下部内ドーパミン (DA) がヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響

## 1. 緒言

ドーパミン (Dopamine、DA) は、中枢神経系に存在する神経伝達物質で、ノルアドレナリン、アドレナリンと共にカテコールアミン類に分類される。DA は D2 受容体を介し、PRL 分泌を抑制的に支配しているが、GH 分泌もその一部の機構が DA により修飾されていることが示唆されている [3,15,42]。ヒトにおいて、血漿中の GH 濃度は DA 注入により大きく上昇することが報告されている [3]。また、先端肥大症のヒトにおいて、DA が下垂体腺腫の GH 分泌に対する直接の抑制作用や視床下部に対する促進作用を持つことが報告されている [42]。

DA は血液脳関門を通過できないため、血液脳関門を通過できる L-dopa (DA の前駆体) が DA の影響を調べる実験に用いられている [3,42,43,132]。L-dopa は末梢及び中枢で芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase、AADC) の作用により DA になり [117]、末梢血中及び中枢神経系の DA 含量を増加させる [3]。L-dopa の経口投与はヒトの GH 濃度を上昇させるが、その作用部位は主に視床下部であること、またその一部は正中隆起であることが報告されている [43]。また、ウシに L-dopa を静脈内投与すると中枢に到達すること、そして脳内の DA 含量が増加することが報告されている [61]。血液脳関門を通過できない AADC の抑制剤 Carbidopa は L-dopa の末梢での AADC より DA への変換反応を阻害する [3,104]。ヒトにおいて、Carbidopa と L-dopa の併用投与は L-dopa の単独投与より血漿中 DA 濃度を減少させ [15,103]、視床下部内の DA 含量をより増加させることが報告されている [3,91,104]。

ヒトにおいて GH 分泌が DA 作動性ニューロンによって調節される部位は、PRL と同様に血液脳関門内にある視床下部と血液脳関門外にある正中隆起及び下垂体であると示唆されている [3]。しかし、反芻家畜の GH 分泌における DA 作動性ニューロンによる制御メカニズムはまだ明らかにされていない。GH は視床下部から GHRH ニューロン及び SS ニューロンにより制御されているが、視床下部内の多くの神経ペプチドによる調節も受ける。視床下部には DA 作動性ニューロンが広範に存在するため、視床下部の DA がこれらの GH 分泌と関係する神経ペプチドを介して GH 分泌に影響す

る可能性もある。

本章では、視床下部の DA が GH 分泌に及ぼす機構の一端を明らかにするため、長日条件下で視床下部の DA 含量を Carbidopa と L-dopa により増加させ、GHRH 及び GHRP-2 で誘起される GH 放出反応を調べた。また、合わせて PRL 促進因子である Salsolinol (SAL) と TRH で誘起される PRL 放出反応についても検討した。

## 2. 材料及び方法

### 1) 供試動物

供試動物は家畜繁殖学研究室飼養の1~2歳の雄シバヤギ5頭(#842、#844、#835、#836、#837)であった。実験開始時のヤギの体重は12.8~28.6 kg ( $23.1 \pm 2.9$ kg)であった。

実験期間中ヤギは、日長、温度及び湿度を制御できる環境制御室内で1頭ずつペンに入れ飼養し、朝9:00 - 10:00間に1回サイレージと濃厚飼料を十分量の水と共に給餌した。3週間ずつ同一環境内で飼養し、環境に十分馴致させたのち、実験を行った。水は実験期間中自由に飲水させた。

### 2) 環境設定

実験期間中に設定した照明、温度、湿度及び照度はそれぞれ16時間明期(08:00 - 24:00):8時間暗期(24:00 - 08:00)(16:8L:D)、20°C、60%及び900ルクスであった。

### 3) カテーテルの取り付け

第2章第1節の実験で記述した方法に従った。

### 4) 試薬及び投与

GHRH、GHRP-2及びTRHは第2章第1節の実験で記述した方法と同様に行った。

Carbidopa (Carbidopa Monohydrate、東京化成工業株式会社)及びL-dopa (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-alanine、東京化成工業株式会社)は、実験前日に1 mg/kg b.w.になるように9 mlの生理食塩水で50°Cに加温しながら溶解し、室温に保存した。

[R]-Salsolinol (SAL-hydrobromide、F. Fülöp 博士 合成、Szeged 大学、Hungary、G. M. Nagy 博士 提供、Semmelweis 大学、Hungary)は、実験当日に5 mg/kg b.w.になるように生理食塩水で2 mlに希釈した。

全ての試薬はエクステンションチューブより頸静脈内に投与した。また対照には生理食塩水を投与した。

#### 5) 採血方法

GHRH、GHRP-2、SAL、TRH 及び生理食塩水の投与は 2 日間隔で行い、12 : 00 から 15 : 00 まで (明期 3 時間) の間に採血を行った。採血は 15 分間隔で計 13 回行い、GHRH、GHRP-2、SAL 及び TRH の投与は採血開始 60 分後に行った。Carbidopa 及び L-dopa の投与は、それぞれ採血開始 30 分及び 45 分後に行った。採血方法は第 2 章の実験で記述した方法に従った。

#### 6) ホルモン濃度の測定

血漿中 GH 及び PRL 濃度の測定は第 2 章第 1 節の実験で記述した方法に従った。すべての GH 及び PRL 試料は、二重測定を行った。血漿中 GH のアッセイは 2 回行い、測定限界値は 0.3 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 8.1%、アッセイ間変動係数は 3.2% であった。PRL のアッセイは 1 回行い、測定限界値は 0.13 ng/ml で、アッセイ内変動係数は 8.5% であった。

#### 7) データ分析

第 2 章第 1 節の実験で記述した方法に従った。

### 3. 結果

#### 1) Carbidopa と L-dopa 処理による GH 濃度の変化

Carbidopa と L-dopa 処理における血漿中 GH 濃度の変化と Carbidopa と L-dopa 処理後 60 分間の AUC を 5 頭の平均値で Fig.22 に示す。Carbidopa と L-dopa を投与すると血漿中 GH 濃度は減少した。Carbidopa と L-dopa 投与区 ( $152.4 \pm 26.6 \text{ ng} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) の AUC は対照区 ( $366.6 \pm 98.1 \text{ ng} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) に比べ有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。

#### 2) Carbidopa と L-dopa 処理時の GHRH により誘起される GH 放出反応

GHRH、Carbidopa 及び L-dopa を投与した時の血漿中 GH 濃度の変化を 5 頭の平均値で Fig.23 に示す。GHRH を単独投与すると血漿中 GH 濃度は上昇し、投与後 15 分をピークとする GH の一過性放出が見られた。GH ピーク値は  $39.8 \pm 7.8 \text{ ng/ml}$  であった。投与 15 分と 30 分後の GH 濃度は対照区に比べ有意に高かった ( $P < 0.05$ )。GHRH 投与により誘起された GH 放出反応は L-dopa と Carbidopa 処理により有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

#### 3) Carbidopa と L-dopa 処理時の GHRP-2 により誘起される GH 放出反応

GHRP-2、Carbidopa 及び L-dopa を投与した時の血漿中 GH 濃度の変化を 5 頭の平均値で Fig.24 に示す。GHRP-2 単独投与区及び GHRP-2 と Carbidopa と L-dopa 投与区とも、GHRP-2 投与 15 分後から対照区に比べ有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。GHRP-2 単独投与区及び GHRP-2 と Carbidopa と L-dopa 投与区の間には有意差は見られなかった。

#### 4) Carbidopa と L-dopa 処理による PRL 濃度の変化

Carbidopa と L-dopa 処理における血漿中 PRL 濃度の変化を 4 頭の平均値で Fig.25 に示す。Carbidopa と L-dopa を投与すると血漿中 PRL 濃度は有意に減少した ( $P < 0.05$ )。

#### 5) Carbidopa と L-dopa 処理時の SAL により誘起される PRL 放出反応

SAL、Carbidopa 及び L-dopa を投与した時の血漿中 PRL 濃度の変化を 4 頭の平均値で Fig.26 に示す。SAL 単独投与区及び SAL と Carbidopa と L-dopa 投与区とも、SAL 投与 15 分後から対照区に比べ有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。SAL の投与により誘起された PRL 放出反応は Carbidopa と L-dopa 投与により有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

#### 6) Carbidopa と L-dopa 処理時の TRH により誘起される PRL 放出反応

TRH、Carbidopa 及び L-dopa を投与した時の血漿中 PRL 濃度の変化を 4 頭の平均値で Fig.27 に示す。TRH 単独投与区及び TRH と Carbidopa と L-dopa 投与区とも、TRH 投与 15 分後から対照区に比べ有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。TRH の投与により誘起された PRL 放出反応は Carbidopa と L-dopa 投与により有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

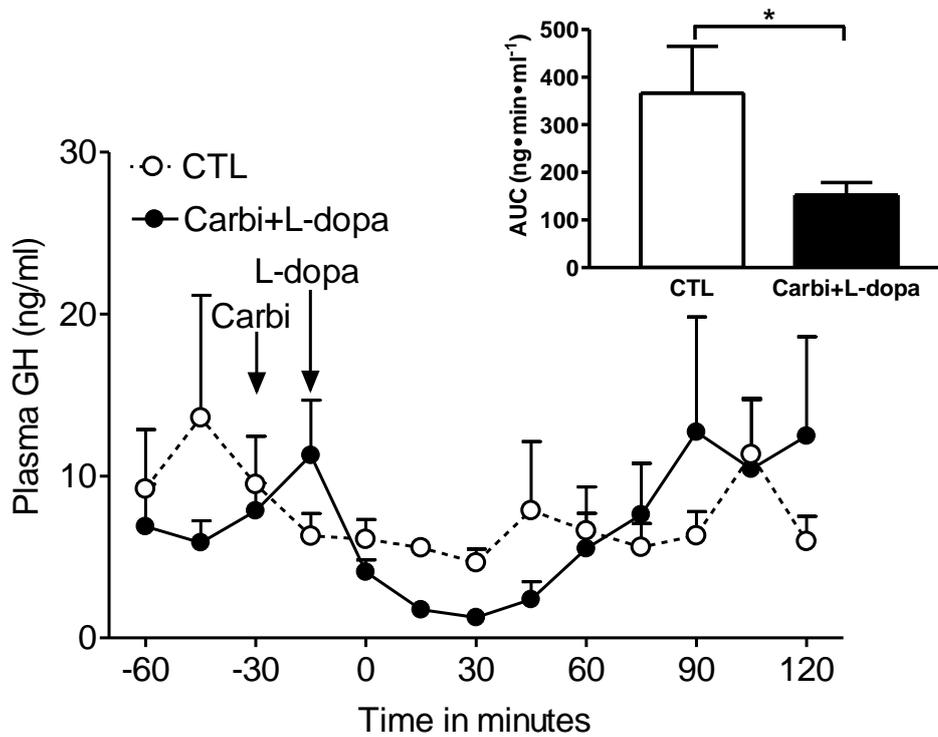


Fig. 22. Plasma concentrations of GH in response to i.v. injection of Carbi (1 mg/kg b.w.) and L-dopa (1 mg/kg b.w.) in male goats under the long (16:8 L:D) photoperiod condition. An i.v. injection of saline was given as a control (CTL). The time 0 indicates the time of the GHRH or GHRP-2 injection in later experiments. Arrows indicate the time of injection. Note that the AUC of GH for the 1-h period after L-dopa treatment is also indicated in the figure. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for five goats. \*Significant differences ( $P < 0.05$ ).

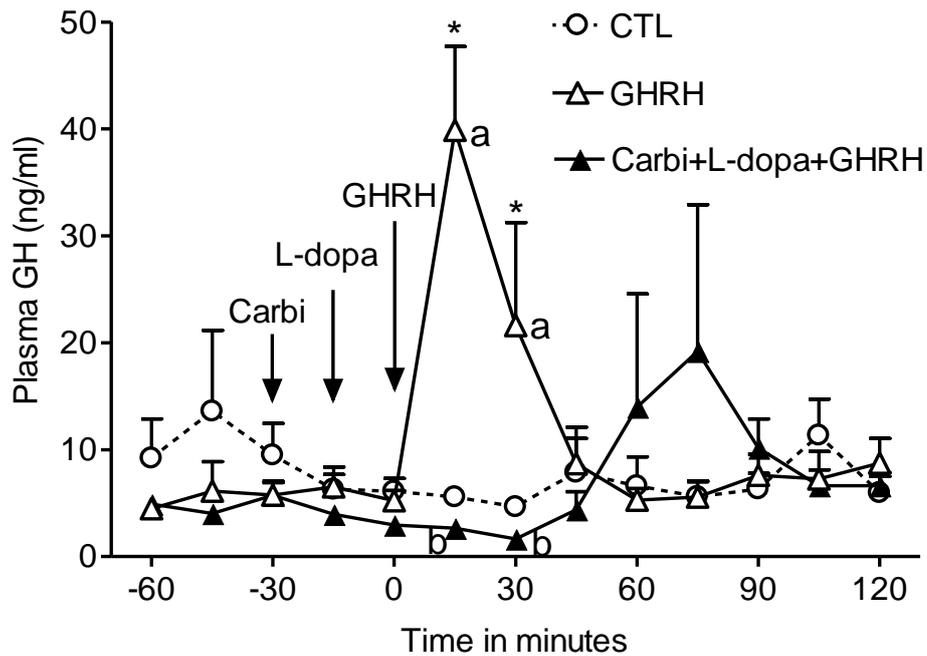


Fig. 23. Plasma concentrations of GH in response to i.v. injection of GHRH (0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) before and after treatment with carbi (1 mg/kg b.w.) and L-dopa (1 mg/kg b.w.) in male goats under the long (16:8 L:D) photoperiod condition. Carbi and L-dopa were administered 30 min and 15 min, respectively, before the injection of GHRH. An i.v. injection of saline was given as a control (CTL). Each value represents the mean  $\pm$  SEM for five goats. Arrows indicate the time of the injections. The different letters (a, b) at each time period denote significant differences ( $P < 0.05$ ). \* $P < 0.05$  significantly different from the controls.

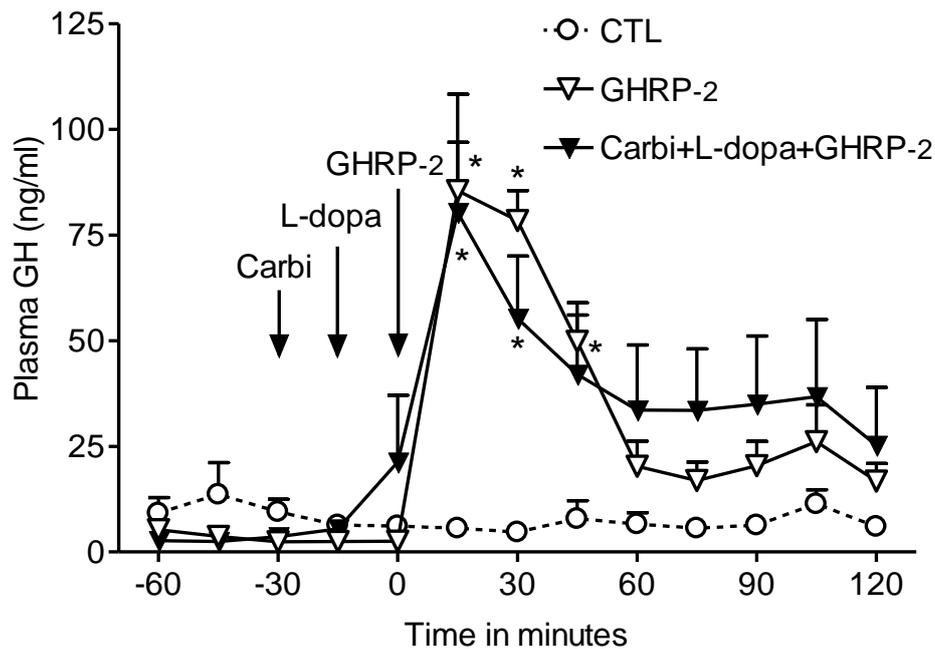


Fig. 24. Plasma concentrations of GH in response to i.v. injection of GHRP-2 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) before and after treatment with carbi (1 mg/kg b.w.) and L-dopa (1 mg/kg b.w.) in male goats under the long (16:8 L:D) photoperiod condition. Carbi and L-dopa were administered 30 min and 15 min, respectively, before the injection of GHRP-2. An i.v. injection of saline was given as a control (CTL). Each value represents the mean  $\pm$  SEM for five goats. Arrows indicate the time of the injections. \* $P < 0.05$  significantly different from the controls.

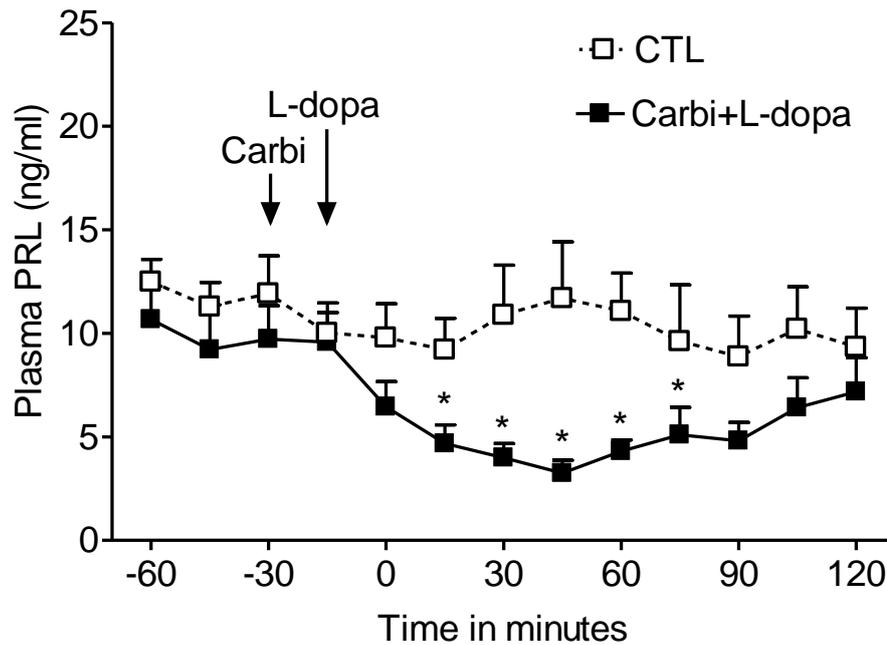


Fig. 25. Plasma concentrations of PRL in response to i.v. injection of carbidopa (Carbi, 1 mg/kg b.w.) and L-dopa (1 mg/kg b.w.) in male goats under the long (16:8 L:D) photoperiod condition. An i.v. injection of saline was given as a control (CTL). The time 0 indicates the time of the salsolinol (SAL) or TRH injection in later experiments. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. Arrows indicate the time of injection. \* $P < 0.05$  significantly different from the controls.

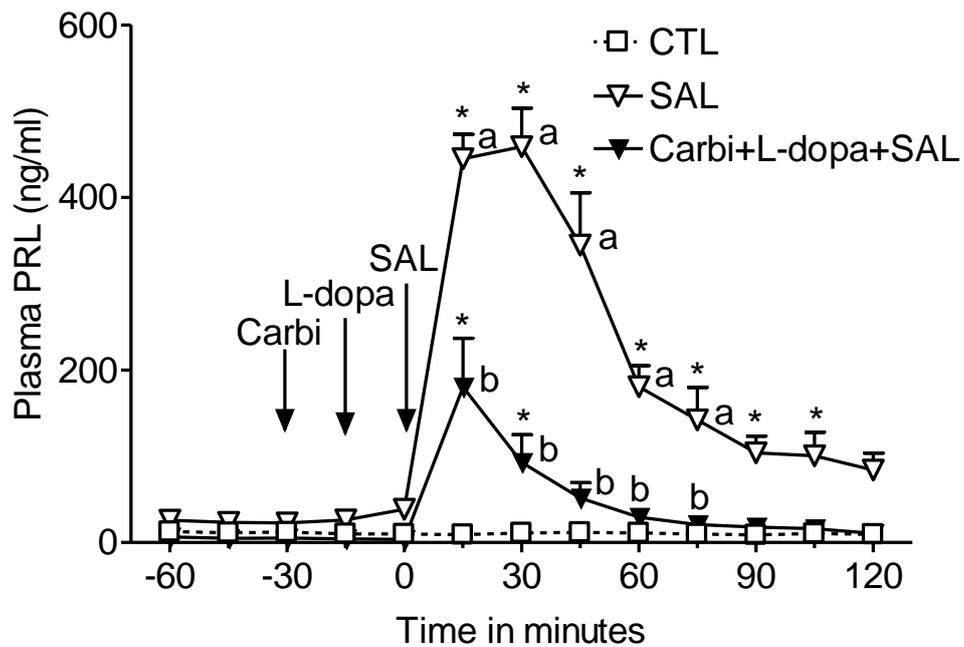


Fig. 26. Plasma concentrations of PRL in response to i.v. injection of SAL (5 mg/kg b.w.) before and after treatment with carbi (1 mg/kg b.w.) and L-dopa (1 mg/kg b.w.) in male goats under the long (16:8 L:D) photoperiod condition. Carbi and L-dopa were administered 30 min and 15 min, respectively, before the injection of SAL. An i.v. injection of saline was given as a control (CTL). Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. Arrows indicate the time of the injections. The different letters (a, b) at each time period denote significant differences ( $P < 0.05$ ). \* $P < 0.05$  significantly different from the controls.

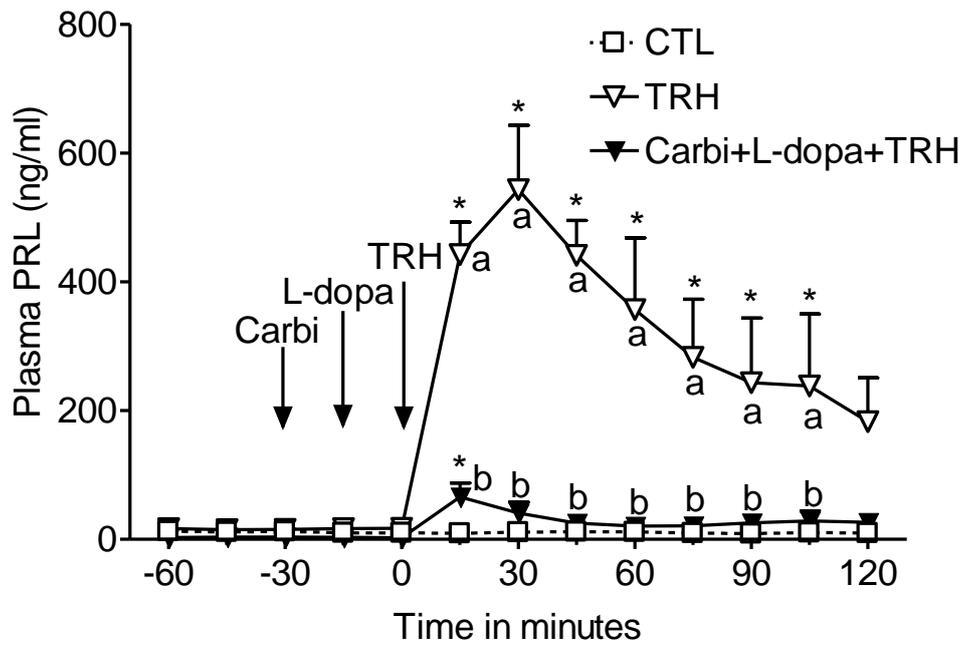


Fig. 27. Plasma concentrations of PRL in response to i.v. injection of TRH (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.) before and after treatment with carbi (1 mg/kg b.w.) and L-dopa (1 mg/kg b.w.) in male goats under the long (16:8 L:D) photoperiod condition. Carbi and L-dopa were administered 30 min and 15 min, respectively, before the injection of TRH. An i.v. injection of saline was given as a control (CTL). Each value represents the mean  $\pm$  SEM for four goats. Arrows indicate the time of the injections. The different letters (a, b) at each time period denote significant differences ( $P < 0.05$ ). \* $P < 0.05$  significantly different from the controls.

#### 4. 考 察

ヒトにおいて、GH は PRL と同様に末梢 (脳下垂体及び正中隆起) 及び中枢の両方で DA の調節作用を受けるが [3,43]、GH の DA による作用の部位は特に中枢で高い可能性が示されている [3]。Carbidopa 処理は末梢血中の AADC の作用を完全に抑制できないが、血漿中の DA 濃度の上昇反応を抑制する [3,15]。また、Carbidopa と L-dopa の併用により視床下部の隆起漏斗 DA 作動性ニューロンから放出される DA 量を増加させる [104]。本研究では、Carbidopa と L-dopa の投与により血漿中 GH 基礎濃度が減少すると共に、GHRH で誘起される GH 放出反応も抑制された。したがって、本研究の GH 放出の抑制は視床下部の DA 含量の増加と関連していることが推察された。

SSはGHの放出を抑制するのみならず、GHRHの放出やGHRHで誘起されるGH分泌も抑制することが知られている [10]。ラットにおいて、DAが視床下部内神経のシナプスを介しSS分泌を刺激することが示唆されている [124]。また、DAの受容体は機能によってD1とD2受容体に分けられ、それぞれポジティブ及びネガティブな機能を有する [86]。去勢牛では、給餌前にDAのD1受容体アゴニストであるSKF38393を皮下投与すると、室周囲核のSSニューロンの活性を増加させ、この増加したSSが血漿中GHの基礎濃度及びGHRHで誘起されるGH放出を抑制したことが報告されている [82]。さらに、ウシの視床下部組織にD1受容体のアゴニストを灌流するとSSの放出が促進され、GHRHの放出が抑制されるが、D2受容体にはこのような影響がないことが報告されている [127]。これらの報告から、本研究のCarbidopaとL-dopaの併用によってGHの分泌またはGHRHで誘起されたGH放出反応が抑制されたのは、恐らく視床下部内に増加したDAが室周囲核のSSニューロンの活性を高めたことに起因すると推察される。

一方、DAはD1受容体を介し視床下部SSニューロンのSS分泌を刺激するが [82]、D2受容体もソマトトロフへのGH分泌を抑制することが示唆されている [83]。ヒトのin vitro実験では、DAのD2受容体のアゴニスト処理は下垂体腫瘍から分泌されるGH濃度を30%減少させたことが報告されている [40]。また、ヒツジの下垂体細胞にDA処理すると、GHの基礎分泌及びGHRHによるGH放出とも抑制させるとの報告もある [78]。

これらのことから、視床下部内に増加したDAが下垂体へ直接的に作用し、GH分泌とGHRHで誘起されたGH放出反応が抑制された可能性も考えられる。

GHRP-2で誘起されたGH放出反応はCarbidopaとL-dopa投与によって影響されないことが示された。GHRHとGHRP-2のGH放出機構は異なるので、GHRHとGHRP-2により誘起されるGH放出反応に対するDAの影響も異なると考えられた。

CarbidopaとL-dopaの併用投与により視床下部の隆起漏斗DA作動性ニューロンから放出されるDA濃度が増加することが報告されている [104]。本研究では、CarbidopaとL-dopaの投与によって血漿中PRL濃度が有意に減少したことから、本研究でも視床下部のDA含量が増加していたことが推察された。

SAL単独投与後PRL濃度が上昇した結果は、本研究室のヤギやウシの報告 [47-50]と一致した。SALの作用はDAのD2受容体とは異なる別の受容体を介して起きる [116,117]。ラットにおいてPRL分泌と関係するSALの結合部位は下垂体の前葉、中葉、後葉、正中隆起及び視床下部にあることが報告されている [52,116,117]。また、ウシのin vitro実験において、SAL処理によって下垂体前葉及び後葉細胞のPRL分泌が刺激されることも報告されている [49,50]。静脈内投与したSALは血液脳関門を通過できないが [94]、SALは下垂体や正中隆起に直接作用できると考えられる。SALで誘起されたPRL放出反応はCarbidopaとL-dopa投与によって有意に抑制されたが、これは視床下部のDAニューロン内のDA合成量が増加し、下垂体門脈中に放出されたDAが増加し、PRLの基礎分泌やSALで誘起されたPRL放出が抑制されたためと考えられた。

本研究でのTRHにおける結果はSALの結果と同様に、TRH単独投与後のPRL濃度は上昇したが、このPRL放出反応はCarbidopaとL-dopa投与によって有意に抑制された。この結果はウシのin vitro実験の結果を支持する。すなわち、ウシの下垂体前葉細胞において、SAL及びTRHにより放出されるPRLはDAにより完全にブロックされている [50]。また、CarbidopaとL-dopa処理によってTRHで誘起されたPRL放出反応が有意に抑制されることはヒトにおける実験の結果と一致した [16,91]。CarbidopaとL-dopa投与によるPRL分泌抑制はCarbidopaとL-dopaより視床下部のDAニューロン内のDA合成量

が増加し、下垂体門脈中に放出されたDA量が増加したためと考えられる。DAはラクトトロフ細胞膜上のD2受容体と結合し、細胞内のACやホスホリパーゼ C (PLC) の活性を抑え、PRL分泌を抑制する。一方、TRHはラクトトロフ内のPLCを活性化することにより、PRLの分泌を引き起こす [132]。CarbidopaとL-dopa投与により増加したDAはTRHによりラクトトロフ内で活性化するPLCを抑制することにより、PRL放出反応を弱めたと考えられた。

以上の結果から、Carbidopa と L-dopa 投与により視床下部内の DA 含量を増加させると、GH の分泌及び GHRH による GH 放出反応が抑制されることが分かった。また TRH と SAL による PRL 放出反応も抑制されることが明らかになった。これらの結果から、ヤギにおいて長日期に視床下部内の DA 含量が GH 分泌に影響することが示唆された。

## 5. 要 約

本研究は視床下部内の DA がヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響を明らかにするために、視床下部内 DA 含量を変化させた時の GHRH 及び GHRP-2 により誘起される GH 放出反応、また SAL 及び TRH により誘起される PRL 放出反応を調べた。実験は長日条件 (16 : 8 L : D) 下で行い、視床下部内の DA 含量は Carbidopa と L-dopa 処理により増加させた。

Carbidopa と L-dopa を投与し、視床下部内の DA 含量を増加させると血漿中 GH 濃度は減少し、Carbidopa と L-dopa 投与後 60 分間の AUC は対照区に比べ有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、GHRH 投与により誘起された GH 放出反応は Carbidopa と L-dopa 投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。しかし、GHRP-2 投与により誘起された GH 放出反応は Carbidopa と L-dopa 投与による影響は見られなかった。Carbidopa と L-dopa 投与により PRL 放出量は対照区に比べ有意に減少した ( $P < 0.05$ )。SAL 投与により誘起された PRL 放出反応は Carbidopa と L-dopa 投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。また、TRH 投与により誘起された PRL 放出反応も Carbidopa と L-dopa 投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

以上の結果から、視床下部内の DA 含量が増加すると、GHRH による GH 放出反応または TRH 及び SAL による PRL 放出反応とも抑制されることが分かった。これらの結果から、ヤギにおいて長日期に視床下部内の DA 含量が GH 分泌に影響することが示唆された。

## 第 5 章

### 総 括

本研究は、まだ明解な解答が得られていない、反芻家畜における光と GH 分泌パターンとの関係を明らかにしようとした。すなわち、家畜生産に重要な GH の日長による分泌パターンの変化やその機序を、光によりその分泌に影響することが分かっている PRL の変化と対比しながら明らかにしようとした。本研究では、ウシのモデル動物として知られているシバヤギを人工気象室内で飼養して実験を行った。

第 2 章では、日長変化に伴う昼間 (明期) 及び夜間 (暗期) の雌ヤギの血中 GH 及び PRL の分泌特性と、GHRH による GH 放出反応及び TRH による PRL 放出反応を調べた。また、メラトニン (MEL) が GH と PRL の分泌に与える影響についても調べた。実験は 20°C 下で日長を 8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に変化させて行った。

昼間において、8 : 16 L : D 区及び 16 : 8 L : D 区の GH パルス頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高くなった ( $P<0.05$ )。さらに 8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に GHRH を投与後 60 分間の AUC では、8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の PRL パルス頻度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は低い傾向にあった ( $P<0.1$ )。PRL パルスの振幅及び平均 PRL 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に TRH を投与した結果、投与後 120 分間の PRL 濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。以上の結果から、日長を延長させると GH と PRL 分泌は共に亢進することが明らかになった。また GH の亢進は主にパルス振幅の増加に伴う GH 濃度の上昇であることが分かった。GHRH による GH 分泌は日長延長により亢進することも明らかになった。

夜間において、8 : 16 L : D 区及び 16 : 8 L : D 区の GH パルスの頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及

び 8 : 16 L : D の PRL パルス頻度には有意な変化は見られなかった。PRL パルスの振幅及び平均 PRL 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。16 : 8 L : D 区では消灯後平均 PRL 濃度は急激に上昇し、消灯前の平均値に比べ、消灯後 1 時間から 2.25 時間までの値は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。8 : 16 L : D 区でも平均 PRL 濃度は消灯後上昇する傾向が見られた。以上の結果から、光に対する GH 分泌反応は PRL のように明瞭ではないが、長日条件では昼と同様に夜間でも GH 分泌が亢進することが明らかになった。また PRL は消灯後 GH と異なり、急激に上昇することも明らかになった。

MEL 経口投与後、血漿中 MEL の濃度は有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。MEL 投与区及び生食投与区の GH パルスの頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅及び平均 GH 濃度は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。さらに MEL 投与区及び生食投与区に GHRH を投与直後から 30 分までの GH 濃度は、MEL 投与区は生食投与区に比べ有意に低かった ( $P < 0.05$ )。PRL パルスの頻度には生食投与区に比べ MEL 投与区は高い傾向にあった ( $P = 0.06$ )。PRL パルスの振幅及び平均 PRL 濃度は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。さらに、MEL 投与区及び生食投与区の TRH 投与直後から 120 分までの PRL 濃度は生食投与区に比べ、MEL 投与区は有意に低かった ( $P < 0.05$ )。以上の結果から、MEL で処理すると GH 及び PRL 共に、日長を 16L から 8L に変化させたときの結果と類似することが分かった。また MEL 処理による GH パルス振幅の減少に伴い GH 濃度が低くなること、GHRH による GH 分泌は MEL 処理により抑制されることが明らかになった。さらに、MEL 処理による PRL 分泌の低下は主に基礎濃度の減少によること、また TRH による PRL 分泌は MEL 処理により抑制されることも明らかになった。

第 3 章では、性差を明らかにするために第 2 章と同様の日長条件下で雄ヤギ用いて、雄ヤギの血中 GH と PRL 分泌特性に及ぼす日長の影響を調べた。また、GHRH 及び GHRP-2 による GH 放出反応及び TRH による PRL 放出反応も合わせて検討した。さらに、日長変化に伴う明期の雄ヤギの IGF-1 及び T 濃度の変化も調べた。8 : 16 L : D 区

及び 16 : 8 L : D 区の GH パルスの頻度には有意な変化は見られなかった。GH パルスの振幅は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は高い傾向が見られた ( $P=0.1$ )。また 16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 GH 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。さらに、8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に GHRH で投与した結果、GH のピーク濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D における GHRP-2 による GH の放出反応には有意な変化は見られなかった。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D の PRL パルス頻度には有意な変化は見られなかった。PRL パルスの振幅及び平均 PRL 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。さらに、8 : 16 L : D 及び 16 : 8 L : D に TRH を投与した結果、投与直後から 120 分までの PRL 濃度は 8 : 16 L : D 区に比べ、16 : 8 L : D 区は有意に高かった ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 IGF-1 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に高い値を示した ( $P<0.05$ )。16 : 8 L : D 及び 8 : 16 L : D における平均 T 濃度は 8 : 16 L : D に比べ 16 : 8 L : D 区は有意に低かった ( $P<0.05$ )。以上の結果から、日長を延長させると雄ヤギの T 分泌は低下するが、GH、PRL、IGF-1 分泌は亢進することが明らかになった。また GH の亢進は主にパルス振幅の増加に伴う GH 濃度の上昇に起因し、雄ヤギの GH 分泌は雌と同様に日長により影響されることが分かった。また GHRH による GH 分泌は日長の延長により高まるが、GHRP-2 ではその影響が少ないことも分かった。

第 4 章では、視床下部内の DA がヤギの GH と PRL 分泌に及ぼす影響を明らかにするために、視床下部内 DA 含量を変化させた時の GHRH 及び GHRP-2 により誘起される GH 放出反応、また SAL 及び TRH により誘起される PRL 放出反応を調べた。実験は長日条件 (16 : 8 L : D) 下で行い、視床下部内の DA 含量は Carbidopa と L-dopa 処理により増加させた。Carbidopa と L-dopa を投与すると血漿中 GH 濃度は減少し、Carbidopa と L-dopa 投与後 60 分間の AUC は対照区に比べ有意に低くなった ( $P<0.05$ )。また、GHRH の投与により誘起された GH 放出反応は Carbidopa と L-dopa 投与によって有意に抑制された ( $P<0.05$ )。GHRP-2 の投与により誘起された GH 放出反応には

Carbidopa と L-dopa 投与による影響はなかった。Carbidopa と L-dopa を投与すると PRL 放出量は対照区に比べ有意に減少した ( $P < 0.05$ )。SAL により誘起された PRL 放出は Carbidopa と L-dopa 投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。TRH により誘起された PRL 放出は Carbidopa と L-dopa 投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。以上の結果から、視床下部内の DA 含量を増加すると、GHRH による GH 放出反応や TRH と SAL による PRL 放出反応は抑制されることが分かった。ヤギにおいて長日期に視床下部内の DA 含量が GH 分泌に影響することが明らかになった。

本研究で得られた知見は、日長を人為的に制御することにより GH や PRL の分泌能を高め、乳牛では泌乳量の増加、また、肉牛では増体効率を高める技術開発などに応用でき、家畜の新しい飼養管理技術の確立に貢献できると期待される。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜った主指導教員の岩手大学農学部 橋爪 力 教授に深く感謝致します。また御校閲及び御助言を賜った第 1 副指導教員の岩手大学農学部 澤井 健 准教授、第 2 副指導教員の弘前大学農学生命科学部 鈴木 裕之 教授並びに帯広畜産大学生命科学ユニット 桑山 秀人 教授に深く感謝致します。

本研究で使用したウシ GH の第一抗体を御提供頂きました元農林水産省畜産試験場 上家 哲 博士、ウシ GH の標準ホルモン、ヒツジ PRL の第一抗体及び標準ホルモンを御提供頂きました米国 Harbor-UCLA 医学センター A. F. Parlow 博士、Salsolinol を合成して頂きましたハンガリー Szeged 大学 F. Fülöp 教授並びに Salsolinol の御提供並びにご助言を頂きましたハンガリー Semmelweis 大学 G. M. Nagy 教授に感謝致します。また、ホルモン測定時に御協力頂きました本学 RI 総合実験室の秋葉 文仁 技官及び杉島 正樹 技官に深く感謝致します。

最後に、本研究の遂行にあたり御協力、御助言を頂いた家畜繁殖学研究室の八重樫 朋祥 修士、斉藤 隼人 修士、澤田 建 修士、後藤 由希 修士、遊佐 瞳 修士、現 4 年生及び卒業生に深く感謝致します。

## 引用文献

1. Abe H, Englar D, Molitch ME, Bollinger-Gruber J, Reichlin S. (1985) Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of prolactin release in the rat. *Endocrinology* 116: 1383-1390.
2. Arendt J. (1995) *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*. Chapman and Hall, London.
3. Bansal S, Lee LA, Woolf PD. (1981) Dopaminergic regulation of growth hormone (GH) secretion in normal man: correlation of L-dopa and dopamine levels with the GH response. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 301-306.
4. Barenton B, Pelletier J, Ortavant R. (1983) Demonstration of the influence of the photoperiod on the plasma concentration of the growth hormone in the ram. *CR Seances Acad Sci III* 297: 327-330.
5. Barenton B, Chabanet C, Pelletier J. (1987) Influence of photoperiod and protein diet on growth hormone secretion in rams. *Proc Soc Exp Biol Med* 185: 312-317.
6. Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM. (1985) Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281.
7. Ben-Jonathan N, Hnasko R. (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22: 724-763.
8. Bern HA, Nicoll CA. (1968) The comparative endocrinology of prolactin. *Rec Prog Horm Res* 24: 681-720.
9. Berthelot X, Laurentie M, Ravault JP, Ferney J, Toutain PL. (1990) Circadian profile and production rate of melatonin in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 7: 315-322.
10. Bluet-Pajot MT, Bertherat J, Epelbaum J, Kordon C. (1993) Neural and pituitary mechanisms involved in growth hormone regulation. *J Pediatr Endocrinol*. 6: 357-369.
11. Buonomo FC, Baile CA. (1990) The neurophysiological regulation of growth hormone secretion. *Domest Anim Endocrinol* 7: 435-450.

12. Buttle HL. (1974) Seasonal variation of prolactin in plasma of male goats. *J Reprod Fert* 37: 95-99.
13. Breier BH, Bass JJ, Butler JH, Gluckman PD. (1986) The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *J Endocrinol* 111: 209-215.
14. Briard N, Rico-Gomez M, Guillaume V, Sauze N, Vuaroqueaux V, Dadoun F, Le Bouc Y, Oliver C, Dutour A. (1998) Hypothalamic mediated action of free fatty acid on growth hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 139: 4811-4819.
15. Camanni F, Picotti GB, Massara F, Molinatti GM, Mantegazza P, Müller EE. (1978) Carbidopa inhibits the growth hormone- and prolactin-suppressive effect of L-dopa in acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 47: 647-652.
16. Carlson HE. (1986) Carbidopa plus L-dopa pretreatment inhibits the prolactin (PRL) response to thyrotropin-releasing hormone and thus cannot distinguish central from pituitary sites of prolactin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 249-251.
17. Carrillo AJ, Thomas BP, Sharp ZD. (1985) Vasoactive intestinal peptide increases prolactin messenger ribonucleic acid content in GH3 cells. *Endocrinology* 116: 202-206.
18. Casanueva FF. (1992) Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21: 483-517.
19. Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA, Guérin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. (1988) Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Reprod Nutr Dev* 28: 409-422.
20. Cheng K, Chan WW, Butler B, Barreto A Jr, Smith RG. (1991) Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 129: 3337-3342.
21. Chowen LA, García-Segura LM, González-Parra S, Argente J. (1996) Sex steroid effects on the development and functioning of the growth hormone axis. *Cell Mol Neurobiol* 16: 297-310.

22. Clark RG, Jansson J-O, Isaksson O, Robinson ICAF. (1985) Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 104: 53-61.
23. Curlewis JD. (1992) Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. *Reprod Fertil Dev* 4: 1-23.
24. Dahl GE, Buchanan BA, Tucker HA. (2000) Photoperiodic effects on dairy cattle: A review. *J Dairy Sci* 83: 885-893.
25. Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. (1980) Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 781-788.
26. Davies JS, Carter DA, Wells T. (2004) Photic stimulation inhibits growth hormone secretion in rats: A hypothalamic mechanism for transient entrainment. *Endocrinology* 145: 2950-2958.
27. Davidson MB. (1987) Effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocrine Reviews* 8: 115-131.
28. Devesa J, Lima L, Tresguerres JAF. (1992) Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol Metab* 3: 175-183.
29. Deveson SL, Arendt J, Forsyth IA. (1990) Sensitivity of goats to a light pulse during the night as assessed by suppression of melatonin concentrations in the plasma. *J Pineal Res* 8: 168-177.
30. Ellis GB, Desjardins C, Freser HM. (1983) Control of pulsatile LH release in male rats. *Neuroendocrinology* 37: 177-183.
31. Etherton TD, Bauman DE. (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 78: 745-761.
32. Finkelstein JW, Roffwarg HP, Boyar RM, Kream J, Hellman L. (1972) Age-related change in the twenty-four-hour spontaneous secretion of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 665-670.

33. Fukata J, Diamond DJ, Martin JB. (1985) Effects of rat growth hormone (rGH)-releasing factor and somatostatin on the release and synthesis of rGH in dispersed pituitary cells. *Endocrinology* 117: 457-467.
34. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy GM. (2000) Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523-1631.
35. Frohman LA, Downs TR, Clarke IJ. (1990) Measurement of growth hormone-releasing hormone and somatostatin in hypothalamic-portal plasma of unanesthetized sheep: spontaneous secretion and response and response to insulin-induced hypoglycemia. *J Clin Invest* 86: 17-24.
36. Gazal S, Kouakou B, Amoah EA, Barb CR, Barrett JB, Gelaye S. (2002) Effects of N-methyl-D, L-aspartate on LH, GH, and testosterone secretion in goat bucks maintained under long or short photoperiods. *J Anim Sci* 80: 1623-1628.
37. George A, Bubenik A. (2006) Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle-a review. *Veterinarski Arhiv* 76: 275-285.
38. Giustina A, Veldhuis JD. (1998) Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and human. *Endocrine Reviews* 19: 717-797.
39. Goldenberg N, Barkan A. (2007) Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36: 37-55.
40. Gruszka A, Culler MD, Melmed S. (2012) Somatostatin analogs and chimeric somatostatin-dopamine molecules differentially regulate human growth hormone and prolactin gene expression and secretion in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 362: 104-109.
41. Hair WM, Gubbay O, Jabbour HN, Lincoln GA. (2002) Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function. *Mol Hum Reprod* 8: 606-611.
42. Hanew K, Sasaki A, Sato S, Goh M, Yoshinaga K. (1987) Growth hormone inhibitory and stimulatory actions of L-dopa in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 255-260.
43. Hanew K, Sato S, Sasaki A, Goh M, Shimizu Y, Yoshinaga K. (1986) The dopaminergic

- regulation of plasma growth hormone secretion in normal subjects. *Tohoku J Exp Med* 148: 151-158.
44. Harrison JL, Miller DW, Findlay PA, Adam CL. (2008) Photoperiod influences the central effects of ghrelin on food intake, GH and LH secretion in sheep. *Neuroendocrinology* 87: 182-192.
  45. Hartman ML, Iranmanesh A, Thorner MO, Veldhuis JD. (1993) Evaluation of pulsatile patterns of growth hormone release in humans: a brief review. *Am J Hum Biol* 5: 603-614.
  46. 橋爪 力. (1995) 神経ペプチドと家畜の成長ホルモン分泌に関する最近の知見. *日畜会報*. 66: 651-665.
  47. Hashizume T, Onodera Y, Shida R, Isobe E, Suzuki S, Sawai K, Kasuya E, Nagy GM. (2009) Characteristics of prolactin-releasing response to salsolinol (SAL) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 36: 99-104.
  48. Hashizume T, Sawada T, Yaegashi T, Saito H, Ezzat Ahmed A, Goto Y, Nakajima Y, Jin J, Kasuya E, Nagy GM. (2010) Characteristics of prolactin-releasing response to salsolinol in vivo in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 39: 21-25.
  49. Hashizume T, Shida R, Suzuki S, Nonaka S, Yonezawa C, Yamashita T, Kasuya E, Sutoh M, Oláh M, Székács D, Nagy GM. (2008) Salsolinol is present in the bovine posterior pituitary gland and stimulates the release of prolactin both in vivo and in vitro in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 34: 146-152.
  50. Hashizume T, Shida R, Suzuki S, Kasuya E, Kuwayama H, Suzuki H, Oláh M, Nagy GM. (2008) Interaction between salsolinol (SAL) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) or dopamine (DA) on the secretion of prolactin in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 34: 327-332.
  51. Hedlund L, Lischko MM, Rollag MD, Niswender GD. (1977) Melatonin: daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. *Science* 195: 686-687.
  52. Homicskó KG, Kertész I, Radnai B, Tóth BE, Tóth G, Fülöp F, Fekete MI, Nagy GM. (2003) Binding site of salsolinol: its properties in different regions of the brain and the pituitary gland of the rat. *Neurochem Int* 42: 19-26.

53. Horseman N, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K. (1997) Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *Embo J* 16: 6926-6935.
54. Jansson JO, Edén S, Isaksson O. (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine Reviews* 6: 128-150.
55. 上家 哲. (1976) 牛プロラクチン及び成長ホルモンのラジオイムノアッセイによる測定法. *畜産試験場年報* 16: 101-109.
56. Kaler LW, Gliessman P, Craven J, Hill J, Critchlow V. (1986) Loss of enhanced nocturnal growth hormone secretion in aging rhesus males. *Endocrinology* 119: 1281-1284.
57. Karg H, Shams D. (1974) Prolactin release in cattle. *J Reprod Fertil* 39: 463-472.
58. Kasuya E, Kushibiki S, Sutoh M, Saito T, Saito T, Ito S, Yayou K, Sakumoto R, Hodate K. (2006) Effect of melatonin injected into the third ventricle on growth hormone secretion in Holstein steers. *J Vet Med Sci* 68: 1075-1080.
59. Kasuya E, Kushibiki S, Yayou K, Hodate K, Ogino M, Sutoh M. (2012) The effect of lighting conditions on the rhythmicity of growth hormone secretion in Holstein steers. *Anim Sci J* 83: 238-244.
60. Kasuya E, Kushibiki S, Yayou K, Hodate K, Sutoh M. (2008) Light exposure during night suppresses nocturnal increase in growth hormone secretion in Holstein steers. *J Anim Sci* 86: 1799-1807.
61. Kasuya E, Yayou K, Sutoh M. (2013) L-DOPA attenuates prolactin secretion in response to isolation stress in Holstein steers. *Anim Sci J* 84: 562-568.
62. Kostoglou-Athanassiou I, Treacher DF, Wheeler MJ, Forsling ML. (1998) Bright light exposure and pituitary hormone secretion. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 48: 73-79.
63. Kostoglou-Athanassiou I, Treacher DF, Wheeler MJ, Forsling ML. (1998) Melatonin administration and pituitary hormone secretion. *Clin Endocrinol* 48: 31-37.
64. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999) Ghrelin is a

- growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
65. Kusakari N, Tajima Y, Itoh S, Sen-na K, Serikawa S, Hatta T, Ohara M, Mori Y. (1991) Diurnal changes in plasma melatonin and the timing of reproductive onset in anestrus sheep fed melatonin. *J Vet Med Sci* 53: 457-461.
  66. Laurentie MP, Barenton B, Charrier J, Garcia-villar R. (1989) Instantaneous secretion rate of growth hormone in lambs: relationship with sleep, food intake, and posture. *Endocrinology* 125: 642-651.
  67. Lee CY, Hunt DW, Gray SL, Henricks DM. (1991) Secretory patterns of growth hormone and insulin-like growth factor-I during peripubertal period in intact and castrate male cattle. *Domest Anim Endocrinol* 8: 481-489.
  68. Lefcourt AM, Bitman J, Wood DL, Akers RM. (1995) Circadian and ultradian rhythms of peripheral growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 12: 247-256.
  69. Leshin LS, Barb CR, Kiser TE, Rampacek GB, Kraeling RR. (1994) Growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons within the porcine and bovine hypothalamus. *Neuroendocrinology* 59: 251-264.
  70. Li CH, Dixon JS, Lo TB, Schmidt KD, Pankov YA. (1970) Studies on pituitary lactogenic hormone. XXX. The primary structure of the sheep hormone. *Arch Biochem Biophys* 141: 705-737.
  71. Lincoln GA. (1992) Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Anim Reprod Sci* 28: 203-217.
  72. Lincoln GA. (2000) Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. Systems ancient and modern. In: Olcese J (ed.), *Melatonin after Four Decades*, pp. 137-153. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
  73. Lincoln GA, Clarke IJ. (1994) Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 6: 251-260.
  74. Lincoln GA, Clarke IJ. (1995) Evidence that melatonin acts in the pituitary gland through a

- dopamine-independent mechanism to mediate effects of daylength on the secretion of prolactin in the ram. *J Neuroendocrinol* 7: 637-643.
75. Lincoln GA, Richardson M. (1998) Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119: 283-294.
  76. Lincoln GA, Tortonese DJ. (1995) Does melatonin act on dopaminergic pathways in the mediobasal hypothalamus to mediate effects of photoperiod on prolactin secretion in the ram? *Neuroendocrinology* 62: 425-433.
  77. Lincoln GA, McNeilly AS, Cameron CL. (1978) The effects of a sudden decrease or increase in daylength on prolactin secretion in the ram. *J Reprod Fertil* 52: 305-311.
  78. Law GJ, Ray KP, Wallis M. (1984) Effects of growth hormone-releasing factor, somatostatin and dopamine on growth hormone and prolactin secretion from cultured ovine pituitary cells. *FEBS Lett* 166: 189-193.
  79. Luque RM, Park S, Kineman RD. (2008) Role of endogenous somatostatin in regulating GH output under basal conditions and in response to metabolic extremes. *Mol Cell Endocrinol* 286: 155-168.
  80. Lu KH, Shaar CJ, Kortright KH, Meites J. (1972) Effects of synthetic TRH on in vitro and in vivo prolactin release in the rat. *Endocrinology* 91: 1540-1545.
  81. Malven PV. (1993) *Mamalian Neuroendocrinology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
  82. McMahon CD, Chapin LT, Lookingland KJ, Tucker HA. (1998) Stimulation of dopamine D1 receptors increases activity of periventricular somatostatin neurons and suppress concentrations of growth hormone. *Domest Anim Endocrinol* 15: 257-265.
  83. McMahon CD, Radcliff RP, Lookingland KJ, Tucker HA. (2001) Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 20: 65-87.
  84. Meinhardt UJ, Ho KK. (2007) Regulation of growth hormone action by gonadal steroids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36: 57-73.
  85. Melmed S. (2009) Acromegaly pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 119: 3189-3202.

86. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78: 189-225.
87. Miura H, Tsuchiya N, Sasaki I, Kikuchi M, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Ohnami Y. (2004) Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *J Anim Sci* 82: 1329-1333.
88. Mogi K, Li JY, Suzuki M, Sawasaki T, Takahashi M, Nishihara M. (2002) Characterization of GH pulsatility in male shiba goats: effects of postpubertal castration and KP102. *Endocr J* 49: 145-151.
89. Mogi K, Yonezawa T, Chen DS, Li JY, Suzuki M, Yamanouchi K, Sawasaki T, Nishihara M. (2004) Relationship between growth hormone (GH) pulses in the peripheral circulation and GH-releasing hormone and somatostatin profiles in the cerebrospinal fluid of goats. *J Vet Med Sci* 66: 1071-1078.
90. Mollett TA, Malven PV. (1982) Chronological profiles of prolactin and growth hormone in lactating cows. *J Dairy Sci* 65: 211-216.
91. Moriondo P, Travaglini P, Nissim M, Faglia G. (1980) Evaluation of two inhibitory tests (nomifensine and L-dopa + carbidopa) for the diagnosis of hyperprolactinaemic states. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 13: 525-533.
92. 日本比較内分泌学会 編 (1988) ホルモンハンドブック. 南江堂. p.127-138, 433-446.
93. Nelson WO, Gaunt R. (1936) Initiation of lactation in the hypophysectomized guinea pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 34: 671-673.
94. Origitano T, Hannigan J, Collins MA. (1981) Rat brain salsolinol and blood-brain barrier. *Brain Res* 224: 446-451.
95. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte JD, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. (1977) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 11: 167-178.
96. Ozawa A, Hodate K, Miyamoto S, Ohtani F, Tsushima T, Johke T. (1991) Plasma profiles

- of insulin-like growth factor-I for 24 hours and after injection of bovine growth hormone in dairy heifers. *Anim Sci Technol (Japan)* 62: 933-938.
97. Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF. (2000) Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 143: R11-R14.
  98. Peters RR, Chanpin LT, Emery RS, Tucker HA. (1980) Growth and hormonal response of heifers to various photoperiods. *J Anim Sci* 51: 1148-1153.
  99. Prakash BS, Meyer HHD, Schallenberger E, van de Wiel DFM. (1987) Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J steroid Biochem* 28: 623-627.
  100. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1185.
  101. Richardson SB, Hollander CS, Prasad JA, Hirooka Y. (1981) Somatostatin release from rat hypothalamus in vitro: effects of melatonin and serotonin. *Endocrinology* 109: 602-606.
  102. Ringuet H, Pelletier G, Brazeau P, Gadreau P, Guilbault LA, Morisset J, Couture Y, Petitclerc D. (1994) Long-term effects of human growth hormone-releasing hormone and photoperiod on hormone release and puberty in dairy heifers. *J Anim Sci* 72: 2709-2717.
  103. Robertson DR, Wood ND, Everest H, Monks K, Waller DG, Renwick AG, George CF. (1989) The effect of age on the pharmacokinetics of levodopa administered alone and in the presence of carbidopa. *Br J Clin Pharmacol* 28: 61-69.
  104. Ruggieri S, Falaschi P, Baldassarre M, D'Urso R, De Giorgio G, Rocco A, Agnoli A. (1982) Prolactin response to acute administration of different L-dopa plus decarboxylase inhibitors in Parkinson's disease. *Neuropsychobiology* 8: 102-108.
  105. Sam S, Frohman LA. (2008) Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinol Metab Clin N Am* 37: 1-22.
  106. Samson WK, Lumpkin MD, MaCann SM. (1986) Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology* 119: 554-560.

107. Schanbacher BD, Crouse JD. (1980) Growth and performance of growing-finishing lambs exposed to long or short photoperiods. *J Anim Sci* 51: 943-948.
108. Shi ZD, Barrell GK. (1991) Requirement of thyroid function for the expression of seasonal reproductive and related changes in red deer (*Cervus elaphus*) stags. *J Reprod Fertil* 94: 251-259.
109. Stanisiewski EP, Ames NK, Chapin LT, Blaze CA, Tucker HA. (1988) Effect of pinealectomy on prolactin, testosterone and luteinizing hormone concentration in plasma of bull calves exposed to 8 or 16 hours of light per day. *J Anim Sci* 66: 464-469.
110. Stanisiewski EP, Chapin LT, Ames NK, Zinn SA, Tucker HA. (1988) Melatonin and prolactin concentrations in blood of cattle exposed to 8, 16 or 24 hours of daily light. *J Anim Sci* 66: 727-734.
111. Stolar MW, Baumann G. (1986) Secretory patterns of growth hormone during basal periods in man. *Metabolism* 35: 883-888.
112. Strobl JS, Thomas MJ. (1994) Human growth hormone. *Pharmacology Reviews* 46: 1-34.
113. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4908-4911.
114. Tannenbaum GS, Martin JB. (1976) Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98: 562-570.
115. Thomas MG, Amstalden M, Hallford DM, Silver GA, Garcia MD, Keisler DH, Williams GL. (2009) Dynamics of GHRH in third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: relationship with serum concentrations of GH and responses to appetite-regulating peptides. *Domest Anim Endocrinol* 37: 196-205.
116. Tóth BE, Homicskó KG, Radnai B, Maruyama W, DeMaria JE, Vecsernyés M, Fekete MIK, Fülöp F, Naoi M, Freeman ME, Nagy GM. (2001) Salsolinol is a putative endogenous neuro-intermediate lobe prolactin-releasing factor. *J Neuroendocrinol* 13: 1042-1050.

117. Tóth BE, Bodnár I, Homicskó KG, Fülöp F, Fekete MI, Nagy GM. (2002) Physiological role of salsolinol: its hypophysiotrophic function in the regulation of pituitary prolactin secretion. *Neurotoxicol Teratol* 24: 655-666.
118. Van Cauter E, Plat L, Copinschi G. (1998) Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep* 21: 553-566.
119. Veldhuis JD. (1996) New modalities for understanding dynamic regulation of the somatotrophic (GH) axis: explication of gender differences in GH neuroregulation in the human. *J Pediatr Endocrinol Metab* 9: 237-253.
120. Veldhuis JD. (1998) Neuroendocrine control of pulsatile growth hormone release in the human: relationship with gender. *Growth Horm IGF Res* 8: 49-59.
121. Von Brackel-Bodenhausen A, Wuttke W, Holtz W. (1994) Effects of photoperiod and slow-release preparations of bromocryptine and melatonin on reproductive activity and prolactin secretion in female goats. *J Anim Sci* 72: 955-962.
122. 若林 克己. (1984) 実験データの整理 (適用機種 : PC-8801, 9801) ライフサイエンス・パソコン・シリーズ 5. 培風館.
123. Wagner C, Caplan SR, Tannenbaum GS. (1998) Genesis of the ultradian rhythm of GH secretion: a new model unifying experimental observations in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275: E1046-E1054.
124. Wakabayashi I, Miyazawa Y, Kanda M, Miki N, Demura R, Demura H, Shizume K. (1977) Stimulation of immunoreactive somatostatin release from hypothalamic synaptosomes by high (K+) and dopamine. *Endocrinol Jpn* 24: 601-604.
125. Wallis M. (1974) The primary structure of bovine prolactin. *Febs Lett* 44: 205-208.
126. Walkden-Brown SW, Restall BJ, Scaramuzzi RJ, Martin GB, Blackberry MA. (1997) Seasonality in male Australian cashmere goats: long term effects of castration and testosterone or oestradiol treatment on changes in LH, FSH and prolactin concentrations, and body growth. *Small Ruminant Res* 26: 239-252.
127. West CR, Lookingland KJ, Tucker HA. (1997) Regulation of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from perfused, bovine hypothalamic slices. II. Dopamine

- receptor regulation. *Domest Anim Endocrinol* 14: 349-357.
128. Wheaton JE, AI-Raheen SN, Massri YG, Marcek JM. (1986) Twenty-four-hour growth hormone profiles in Angus steers. *J Anim Sci* 62: 1267-1272.
  129. Williams LM, Lincoln GA, Mercer JG, Barrett P, Morgan PJ, Clarke IJ. (1997) Melatonin receptors in the brain and pituitary gland of hypothalamo-pituitary disconnected Soay rams. *J Neuroendocrinol* 9: 639-643.
  130. Woller MJ, Everson-Binotto G, Nichols E, Acheson A, Keen KL, Bowers CY, Terasawa E. (2002) Aging-related changes in release of growth hormone and luteinizing hormone in female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5160-5167.
  131. Yamashita S, Melmed S. (1986) Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 118: 176-182.
  132. Yen SSC. (1991) Prolactin in human reproduction. In: Yen SSC, Jaffe RB (eds), *Reproductive Endocrinology*, pp.357-388. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
  133. Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sako R, Yamanouchi K, Nishihara M. (2005) Modulation of growth hormone pulsatility by sex steroids in female goats. *Endocrinology* 146: 2736-2743.

## 英文摘要

Studies on the effects of photoperiod on the secretory pattern of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) in goats

Jin JIN

Summary

A series of experiments was carried out to investigate the effects of photoperiod on the secretion of GH and PRL in goats.

*I. Effects of photoperiod on the secretory patterns of GH and PRL in female goats.*

*Experiment 1:* The aim of the present study was to clarify the effect of photoperiod on daytime (light period) secretion of GH and PRL in goats. Adult female goats were kept at 20°C with an 8-h or 16-h photoperiod, and secretory patterns of GH for 4 h (12.00 to 16.00 hours) in daytime were examined with the profile of PRL secretion. GH was secreted in a pulsatile manner. There were no significant differences in pulse frequency between the 8- and 16-h photoperiods; however, GH pulse amplitude tended to be greater in the group with the 16-h photoperiod ( $P=0.1$ ), and mean GH concentrations were significantly greater in the 16-h photoperiod ( $P<0.05$ ). The GH-releasing response to GH-releasing hormone (GHRH) was also significantly greater for the 16-h photoperiod ( $P<0.05$ ). PRL was secreted in a pulsatile manner. PRL pulse frequency tended to be smaller in the group with the 16-h photoperiod ( $P<0.1$ ). PRL pulse amplitude was greater in the group with the 16-h photoperiod than 8-h photoperiod ( $P<0.05$ ). Mean PRL concentrations were significantly greater in the 16-h photoperiod ( $P<0.05$ ). The PRL-releasing response to thyrotropin-releasing hormone (TRH) was significantly greater for the 16-h photoperiod ( $P<0.05$ ). These results show that a long photoperiod enhances the secretion of GH and PRL in daytime in female goats.

*Experiment 2:* The aim of the present study was to clarify the effect of photoperiod on nighttime (dark period) secretion of GH and PRL in goats. Adult female goats were kept at 20°C with an 8-h or 16-h photoperiod, and secretory patterns of GH for 8-h in the dark period

(15.00 to 24.00 hours for 8-h photoperiod, and 23.00 to 08.00 hours for 16-h photoperiod) were examined with the profile of PRL secretion. GH was secreted in a pulsatile manner in the dark period. There were no significant differences in pulse frequency between the 8- and 16-h photoperiods; however, pulse amplitude tended to be greater in the group with the 16-h photoperiod ( $P=0.1$ ), and mean GH concentrations were significantly greater in the 16-h photoperiod ( $P<0.05$ ). PRL secretion increased quickly after lights off under photoperiods. The PRL-releasing responses were weaker in the 8-h than 16-h photoperiod. The secretory response to photoperiod was more obvious for PRL than GH. These results show that a long photoperiod enhances the nighttime secretion of GH in female goats although the response is not as obvious as that for PRL.

*Experiment 3:* The aim of the present study was to clarify the effect of melatonin (MEL) on secretion of GH and PRL in goats. The female goats were kept under a 16-h photoperiod and the goats were orally administered saline (controls) or MEL for 3 weeks, and the effects of MEL on the secretion of GH and PRL were examined. There were no significant differences in GH pulse frequency between the saline- and MEL-treated groups. However, GH pulse amplitude and mean GH concentrations were significantly greater in the saline-treated group ( $P<0.05$ ). The GH-releasing response to GHRH was also significantly weaker for the MEL-treated groups ( $P<0.05$ ). Mean PRL concentrations were significantly lower for the MEL-treated group than saline -treated group ( $P<0.05$ ). The PRL-releasing response to TRH was significantly weaker for the MEL-treated group ( $P<0.05$ ). These results show that MEL modifies the secretion of GH and PRL in female goats.

## *II. Effects of photoperiod on the secretory patterns of GH and PRL in male goats.*

The aim of the present study was to clarify the effect of photoperiod on the secretory patterns of GH and PRL in male goats. Adult male goats were kept at 20°C with an 8-h or 16-h light photoperiod, and secretory patterns of GH secretion were compared. In addition, plasma profiles of PRL, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and testosterone (T) were also examined to characterize GH secretion. GH was secreted in a pulsatile manner in male goats. There was no significant difference in pulse frequency between the 8-h and 16-h photoperiods.

However, GH pulse amplitude tended to be greater in the group with the 16-h photoperiod ( $P=0.1$ ), and mean GH concentrations were significantly greater in the 16-h photoperiod ( $P<0.05$ ). The GH-releasing response to GHRH was greater in the 16-h than 8-h photoperiod ( $P<0.05$ ). Plasma PRL and IGF-I levels were higher in the 16-h than 8-h photoperiod ( $P<0.05$ ). In contrast, plasma T levels were lower in the 16-h photoperiod ( $P<0.05$ ). These results show that a long photoperiod enhances the secretion of GH as well as PRL and IGF-I, but reduces plasma T concentrations in male goats.

### *III. Effects of hypothalamic dopamine (DA) on the secretion of GH and PRL in goats.*

The aim of the present study was to clarify the effects of hypothalamic DA on secretion of GH and PRL in goats. The GH-releasing response to an intravenous (i.v.) injection of GHRH and GH-releasing peptide-2 (GHRP-2) was examined as well as PRL-releasing response to an i.v. injection of TRH and salsolinol (SAL) after treatment with augmentation of central DA using carbidopa and L-dopa in male goats under 16-h photoperiod conditions. The carbidopa and L-dopa treatments reduced basal GH concentrations ( $P<0.05$ ). The carbidopa and L-dopa treatments inhibited GHRH-induced GH release ( $P<0.05$ ), however, the treatments failed to inhibit GHRP-2-induced GH release. The carbidopa plus L-dopa treatment also reduced basal PRL concentrations ( $P<0.05$ ). The treatments inhibited SAL- and TRH-induced PRL release ( $P<0.05$ ). These results show that hypothalamic DA blunts the GHRH-induced release of GH, SAL- and TRH-induced the release of PRL in goats, which suggests that DA is involved in regulating the secretion of GH and PRL in the hypothalamus in goats.