

# 牛および山羊に於ける乳腺拡散因子

湯原正高, 和田宏

## Mammary Gland Spreading Factor in Cows and Goats.

Masataka YUHARA and Hiroshi WADA

To demonstrate the presence of mammary gland spreading factor in the mammary tissues of pregnant cows and goats was the object of this study.

Mammary tissues were taken from cows at a slaughterhouse. The stage of pregnancy of cows was estimated on the basis of development of the body and growth of hair of their fetuses. Mammary gland tissues of the goats were dissected from the udder of living body, and the stage of pregnancy was counted from the date of mating.

Following dissection the mammary tissues were frozen and fatty tissues were removed from them. And then mammary gland spreading factor was determined mainly by ELLIOTT and Turner's method.

The mammary tissues were homogenized with a 0.1 M sodium acetate buffer of pH 6.0 with 0.15 M sodium chloride. The homogenates were centrifuged for 20 minutes at 2,000 r.p.m., and then the aqueous layer was pipetted off for assay, avoiding fat layer. Finally, the mammary gland extracts were diluted with the buffer to 20 times the weight of initial tissues. Rabbits weighing 2 to 3 kg were clipped on the back. The extract and acetate buffer were injected intradermally alternatively on both sides of the back of the rabbit, using Mantoux's needle. Width and length of the blebs were measured immediately after injection and 30 minutes, 1, 2, 3 and 6 hours later, and then the net area of spread was calculated.

The results obtained from the present study were shown in Table 1. The mammary gland spreading factor was found in the mammary tissues of pregnant cows and goats, but was not detected in the tissue of the nonpregnant goat.

For homogenization of the tissues, mortar seemed to be more effective than the homogenizer. It must be because the former could preserve the activity of the substances better than the latter.

### 緒 言

これまで乳腺は妊娠中期までに發育を完了するものと考えられていたが、最近、WADA and TURNER はマウスの乳腺中の desoxyribosenuclie acid の測定により、妊娠前半期にひきつづき妊娠後半期にも持続的に乳腺が發育することを知った。<sup>1)</sup> 何れにしても乳腺發育の或る段階に於いては新生した腺芽は組織中に穿入進展しなければならない。この乳腺の發育に關し、乳腺拡散因子は乳芽が乳房の結締織への穿入に關与すると云う興味ある見解が發表されている。ELLIOTT and TURNER は妊娠中の実験小動物、すなわちマウス、ラッテ、モルモット、兎などの乳腺組織中に乳腺拡散因子が存在することを報告している<sup>2)</sup>。

本実験は、妊娠中の和牛および山羊などの家畜に於ける乳腺拡散因子 (Mammary Grand Spreading Factor) の存在を確かめるために行なつた。

## I. 実験材料および方法

乳腺拡散因子の測定は ELLIOTT and TURNER がマウス、ラッテなどの実験小動物で行なった方法に準じて行なった。乳腺拡散因子は乳腺組織からの抽出液を家兎の皮内に注射し、一定時間後の拡散面積によつて量的に表わされる。本研究に於いて和牛の乳腺は屠畜場より解体直後の牝のものを採り、山羊の乳腺は生体より2~3g宛採取した。乳腺は採取後、直ちに冷蔵し、出来るだけ脂肪および結締組織を除去した。これらの乳腺1gにつき、0.15M NaCl を含む pH6 の醋酸緩衝液（以後緩衝液）6.25 ml を加え Homogenize し、ついで 2000 r.p.m. で20分間遠心分離を行ない、上層の脂肪をさけて上澄液をピペットで取り出し、これを抽出原液とした。拡散の indicator としては、緩衝液に溶解した2% Evans Blue 液を用いた。試験液はこの抽出原液1:緩衝液1:2% Evans Blue 溶液1の割合に混合調整し、対照液は緩衝液2:2% Evans Blue 1の割合に混合した。この稀釈により、試験液の稀釈倍率はもとの乳腺組織の約20倍になる。

検定には体重2~3kgの白色在来種家兎を用い、その背部を電気バリカンで剪毛し、この兎の背線両側に交互に一定間隔で供試後抽出液および対照液をそれぞれ0.3mlづつ6カ所に皮内注射した。注射には0.5mlのツベルクリン注射器とマントー氏注射針を用い注意深く皮下注射した。また、1試料について少なくとも2頭の兎を用いた。試験液、対照液は同時に注射し、注射直後に水胞部の面積を測り、その後30分、1時間、3時間、6時間にそれらの拡散面積を計算した。すなわち1/20mm副尺付キャリパーで直交する長径と短径を計測し、楕円公式によつて拡散面積を算出し、それぞれの時間に於ける各々の面積から、最初の面積を差引いたものを各時間に於ける拡散面積とした。試験区および対照区の各時間に於ける拡散面積の平均値の差を乳腺拡散因子による拡散とみなした。なお拡散部の周辺を明瞭にするために胡麻油を少量滴下して観察、測定を行なった。抽出方法による影響をみるために Homogenizer の代りに乳鉢を用い、供試乳腺を硝子粉と共に30分間磨砕しその結果を比較した。また稀釈倍率による拡散力の差を見るために、4倍抽出液と20倍抽出液の比較も行なった。4倍抽出液は乳腺に4倍の緩衝液を加えて磨砕し抽出した。なお、山羊の妊娠日数は種付月日より正確に計算したものである。牛の場合は胎仔の体長（頭頂—尾端間）、体重、胸囲などを測定したが、和牛の胎仔發育に関する調査がないので成書にみられる一般の牛の胎仔の發育を参考にし、さらに眼瞼、耳縁、鼻端、背線、尾端、蹄冠部および全身の発毛状況を参考にして推定したもので、必ずしも正確な妊娠日数を示すものではない。

## II. 実験結果および考察

### 妊娠中の和牛の乳腺拡散因子

妊娠中および分娩後の和牛の乳腺拡散因子の測定結果は第1表に示した。この表は試料を皮内注射後30分、1時間、2時間、3時間、6時間に於ける乳腺抽出液と緩衝液の拡散面積の差を示したもので、何れの場合にも試験区の方が拡散面積が大きく、乳腺拡散因子が存在することを示した。乳腺材料は妊娠140日から210日までの和牛6頭並びに子宮および乳房の状態から分娩後又は流産後のものと推定される和牛1頭であつた。

ELLIOTT and TURNER はマウスおよびラッテなどで、注射後30分の拡散面積により拡散量を

Table 1. Spread area induced by extract of mammary gland tissue of cows and goats.

Animal	Animal No.	Stage of pregnancy in days	Spread area over control mm <sup>2</sup>				
			30 min.	1 hr.	2 hrs.	3 hrs.	6 hrs.
Japanese Black breed of cattle	1	140 *	61.0	77.8	64.1	78.6	187.6
	2	180 *	64.6	19.1	70.9	82.4	107.7
	3	180 *	55.8	84.4	50.3	83.8	101.2
	4	190 *	47.6	77.0	102.6	122.5	161.8
	5	210 *	34.1	107.9	102.5	123.1	527.4
	6	210 *	47.3	67.5	146.9	165.3	236.0
	7	Postpartum ?	61.2	80.4	128.5	140.8	146.5
Goat	8	77	48.6	46.2	49.0	51.8	60.2
	9	77 **	39.8	73.6	146.8	220.0	439.6
	10	100	24.0	26.7	53.2	42.1	132.6
	11	130	100.6	51.4	59.6	91.0	250.5
	12	Non pregnant	14.3	-23.5	-14.3	- 8.7	14.0

\* Stage of pregnancy was estimated on the base of fetal development and growth of its hair.

\*\* Dilution : 1 to 4 in weight to tissue.

表わしているが筆者らは30分後の他に、1時間、2時間、3時間および6時間後の拡散面積を計測した。

妊娠140日から210日までの和牛の乳腺抽出液の注射後30分の拡散面積は何れも対照より大きかったが、妊娠日数との間に特別の関係は見られなかった。注射後3時間に於ては乳腺抽出液と対照液との拡散値の差も著明になった。また供試牛の推定妊期の範囲内に於ては、妊娠期の進んだものの方が、拡散値が大きい傾向があつた。6時間後では拡散の周辺部が浸潤して不鮮明になり、面積計測の正確さを欠ぐ恨みがある。

この点から考えて拡散面積の測定は注射後30分よりも3時間が適当と考えられる。第1図、第2図は供試した妊娠140日および210日の和牛の乳腺抽出液注射による拡散面積の時間的経過を図示したものであるが、何れの場合も、乳腺抽出区の拡散面積が対照液のそれよりも大きかった。

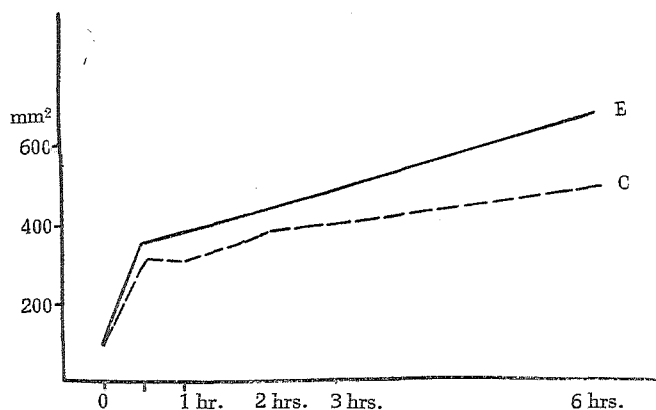


Fig. 1 Spread area of extract from mammary gland tissue of a cow pregnant for 140 days.

C: Control. E: Extract of mammary gland tissue.

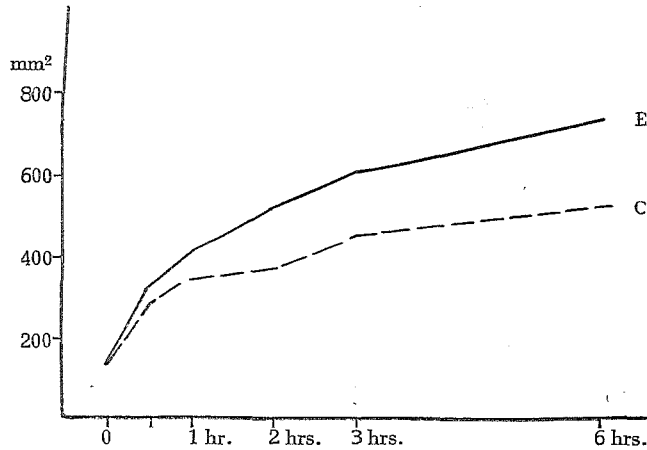


Fig. 2 Spread area of extract from mammary gland tissue of a cow pregnant for 210 days.

C: Control. E: Extract of mammary gland tissue.

#### 妊娠中の山羊の乳腺拡散因子

妊娠 77, 100, 130 日 および 非妊の山羊の乳腺抽出液の拡散の測定結果を同じく第 1 表に示した。妊娠中の乳腺抽出液は対照液に比し、拡散面積が大きく、乳腺拡散因子の存在を示した、然しながら、非妊の山羊の乳腺抽出液と対照液の拡散面積はほぼ同じで、6 時間後に於てほとんど差が見られなかった。

#### 稀釈倍率と拡散面積

本実験の乳腺抽出液の注射液の稀釈倍率は乳腺材料に対する重量比で 20 倍であつたが、稀釈倍率による拡散力の差を見るために、妊娠 77 日の山羊乳腺材料から重量比で 4 倍抽出液をつくり、これと同じ乳腺の 20 倍抽出液の拡散面積を比較した。その結果は第 3 図に示した。

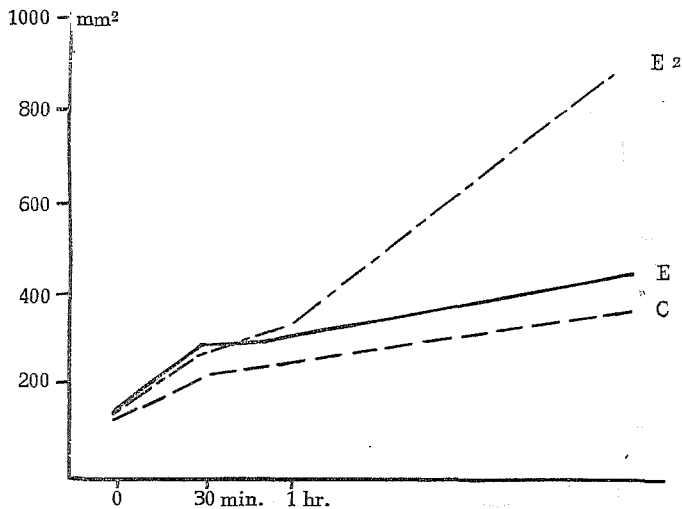


Fig. 3 Spread area of extract of mammary gland tissue of a goat pregnant for 77 days.

C: Control. E1: Extract of mammary gland tissue, 1 to 20 in weight to tissue.  
E2: Extract of mammary gland tissue, 1 to 4 in weight to tissue.

注射後 30 分では、4 倍稀釈も 20 倍稀釈もほとんど差がなかつたが、1 時間以後より差が現われ、時間と共に拡散面積の差が顕著で加速度的に大きくなり、4 倍稀釈の拡散速度が 20 倍稀釈のそれよりも著しく大きかつた。この結果からみても、30 分後の拡散面積の測定は本実験の条件下では少なくとも拡散力の比較方法として適當ではないものと考えられ、また拡散力の差を充分には発現させ得ないことが判つた。乳腺抽出液の濃度は若干倍率が低い方がよい結果を与えることが判つた。

#### 磨碎方法の検討

Homogenizer によつて乳腺を均質化した時、高速度の攪拌による多量の空気との接触により拡散因子が一部破壊されることも予想されたので、この他に、乳鉢に乳腺材料を硝子粉と共に入れ、磨碎し、20 倍に稀釈して供試家兎の背部に注射し、その拡散面積を測定した。

この結果 Homogenize に比し、磨碎区がやや拡散面積が大きかつた。すなわち拡散因子の保全には乳鉢による磨碎の方が好結果を与えた。

実験小動物と異なり中、大家畜では新鮮な乳腺材料の入手困難のため例数が少なく、特に妊娠初期および末期のものが少なかつた。また和牛の場合は産次も不明であつたし、既述の如く正確な妊娠時期は不明で、単に推定に基いたものであつた。しかしながら、妊娠中の和牛および山羊の乳腺組織中に乳腺拡散因子が存在することを認めた。本実験では拡散面積の測定にその測定方法や、使用する兎の栄養状態、特に皮膚の状態、年齢、体重などが影響する。また測定時に兎の姿勢を一定に保つことは非常に重要な問題である。この意味からも、使用する家兎の年齢、体重が略等しく少くとも、2~3 頭を使用するのが望ましい。他の一つの大きな問題は皮膚に対し切創その他により、刺戟を与えた場合その部分の拡散が極めて明らかに妨げられるから、剪毛や脱毛操作の拙劣は拡散面積に影響を与えるものと思われる。このような理由により、皮膚に刺戟を与えないため、薬品による脱毛より、電気バリカンによる剪毛が良かつた。また拡散部に対する胡麻油の滴下は拡散の観察に非常な助けとなり、効果的であることを知つた。Estrogene や Progesterone は、もちろん、乳腺の発達に關与するが、リラキシンは、さらにこれら卵巣のステロイド・ホルモンの効果を助長促進することが最近明らかにされている<sup>6,7,8)</sup>。またこの二つのステロイド・ホルモンは乳腺拡散因子の生成に關与しているが、リラキシンは乳腺拡散因子の生成には直接關係がなく、またこの拡散因子の中にリラキシンは含まれていないと云われている。さらに Hyaluronidase は乳腺拡散因子とは關係がないことが報告されている<sup>2,3,4,5)</sup>。何れにしても、乳腺拡散因子が牛や山羊などの乳腺組織に認められることから、この因子が牛など反芻家畜の乳腺の発達に何らかの役割を演じているものと思われる。この報告は牛および山羊の乳腺に於ける乳腺拡散因子の存在の最初の証明である。

### III. 摘 要

妊娠中の和牛および山羊の乳腺組織中の乳腺拡散因子の存在を確かめるためにこの実験を行なつた。和牛の妊娠程度は屠場より採取し、妊娠日数は胎仔の發育程度、発毛の状態によつて推定した。山羊の乳腺は生体から 2~3g 採取し、妊娠日数は交配の日時から計算した。

乳腺拡散因子の測定は ELLIOTT and TURNER の方法に従つて行ない、その結果は第 1 表に示した。本研究で和牛および山羊の乳腺組織中に乳腺拡散因子が存在することを認めた。しかし非妊の山羊ではその存在を検知することが出来なかつた。

本研究にあたり、多大の御教示と御指導を頂いた小松伊三郎教授に深く感謝する。

## 文 献

- 1) WADA, H. and C. W. TURNER(1959) : J. Dairy Sci., 42 ; 1198.
- 2) ELLIOTT, J. R. and C. W. TURNER(1953) : Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull., No. 537.
- 3) ELLIOTT, J. R. and C. W. TURNER(1951) : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 77 ; 320.
- 4) ELLIOTT, J. R. and C. W. TURNER(1953) : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 82 ; 234.
- 5) ELLIOTT, J. R. and C. W. TURNER(1951) : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 77 ; 33.
- 6) WADA, H. and C. W. TURNER(1958) : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 99 ; 194.
- 7) WADA, H. and C. W. TURNER(1959) : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 101 ; 707.
- 8) WADA, H. and C. W. TURNER(1959) : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 102 ; 568.