

Pantethine の生物学的研究 VIII.

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本獣医学雑誌 = The Japanese journal of veterinary science |
| ISSN | 00215295 |
| 巻/号 | 324 |
| 掲載ページ | p. 201-207 |
| 発行年月 | 1970年9月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



Pantethine の生物学的研究

VIII. マウスの性周期および妊娠におよぼす影響

森田 遙・大森要司・大島康夫

第一製薬株式会社総合研究所生物研究部

(昭和44年9月13日受付)

パントテン酸 (PaA) と生殖機能との関係については、NELSON および EVANS⁹⁾ が、PaA の欠乏の状態においた妊娠ラットで、胎児の吸収、死産あるいは異常児が多いことを認め、妊娠時における PaA の重要性を指摘している。しかし PaA 欠乏に関する多くの動物実験は、主として各種臓器の形態的、組織的变化についてなされており、性腺に対する影響については、まだ明らかでない点が多い。

われわれは、前報⁹⁾ で、PaA あるいはさらに Coenzyme A (CoA) に近い前駆体であるパンテチン (PaSS) には、マウスの産児数を増加する作用があることを報告した。さらにその起因について、卵巣および子宮機能の面から検討を進めている。今回は、マウスの性周期と妊娠におよぼす PaA 欠乏の影響、および PaA と PaSS による回復効果を追求したので、その成績を報告する。

材料および方法

実験飼料：PaA 欠乏合成飼料、PaA 添加合成飼料および CLEA 飼料 (日本クレア製品 CA-1) の3種を用いた。PaA 欠乏合成飼料の組成は、Table 1 に示した。

PaA 添加合成飼料は、PaA 欠乏合成飼料 1 kg 当たり PaA (Ca 塩) 30mg を添加したもので、CLEA 飼料と同様に、対照飼料として用いた。なお、PaA 欠乏合成飼料中の PaA 量は、*Lactobacillus arabinosus* 17-5 株による微生物定量で 1.05mg/kg、CLEA 飼料では 34.7mg/kg であった。

実験動物：生後40日、体重 20~22 g の ddN マウス (日本クレア供給) 雄53匹、雌92匹を用い、

室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、新鮮空気換気1時間につき5回および点灯12時間の空調室で飼育した。ケージは、 $23 \times 40 \times 22\text{cm}$ のアルマイト製のものを使用し、食糞を防止するため金網床とした。マウスは、1ケージにつき5匹ずつ収容し、雄マウスの影響を少なくするため、雄ケージ架台から約6m離れた。また架台の上下段での照度の差を少なくするため、各群のケージを交互に配置した。飼料と水は、常時充分に与えた。

実験方法：21日間 CLEA 飼料を給与し、4、5または6日の間隔で性周期をくりかえすマウスを選抜し、Fig. 1 に示す5群にわけた。

次いで、35日間の PaA 欠乏期間中に、性周期が延長したマウスを3群に分け、PaA 投与群には PaA (Ca 塩) の 51.6mg/kg (体重)、PaSS 投与群には PaSS の 60.0mg/kg (体重) の水溶液を頸部皮下に 0.05ml/10g (体重) の割合で、1週間に5回、5週間投与した。残りの1群には、実験期間中 PaA 欠乏合成飼料を継続給与し、PaA 欠乏群とした。なお対照群として、PaA 添加合成飼料群と CLEA 飼料群の2群を設けた。

性周期検査：毎日午前10時に、スポイト法により腔垢を採取し、ギムザ染色によって、発情前期、発情期、発情後期および休止期の4期に区分して、性周期を観察した。1性周期は発情前期から休止期の終わりまでとし、その平均日数 (MD) を次式により算出した。

$$\text{MD} = \frac{\sum_{i=1}^n D_i}{n}$$

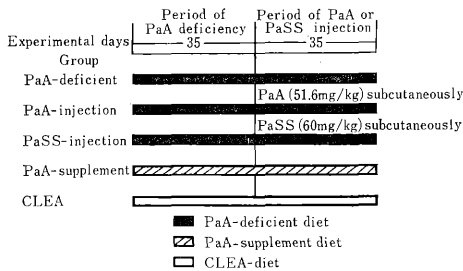
D = 1 周期の日数
n = 実験期間中に出現した性周期の回数

Table 1. Composition of Pantothenic Acid Deficient Diet

| Basal diet | (%) | Vitamins (per 1kg basal diet) | |
|-----------------------------|-----|-------------------------------|--------------|
| Fine granulated sugar | 34 | B ₁ -HCl | 2 mg |
| Fine wheaten starch | 30 | B ₂ | 10 mg |
| Vitamin-free casein | 24 | B ₆ -HCl | 2 mg |
| Cotton seed oil | 8 | PABA | 5 mg |
| Phillips-Hart mixed salt IV | 4 | Nicotinic acid | 10 mg |
| | | Inositol | 200 mg |
| | | Choline chloride | 500 mg |
| | | α -tocopherol | 50 mg |
| | | K ₃ | 2.1 mg |
| | | A | 12,500 I. U. |
| | | D | 1,770 I. U. |

PaA contents (by micro-bioassay): PaA-deficient diet 1.05 mg/kg of diet.
CLEA diet 34.70 mg/kg of diet.

Fig. 1. Experimental Design



また、同式から性周期各期の平均日数 (MD) を求めた。ただし、D は 1 周期の各期ごとの出現日数とした。

妊娠試験: 実験を終了した各群のマウスには、ただちに CLEA 飼料を与え、繁殖能力を確認した同系統の雄と 1 週間同居させた。2 週間後に、全例をと殺開腹して妊娠を確認し、着床数、死亡吸収胎児数を算定した。また妊娠末期の胎児については、外部異常を検査した。

実験成績

1. CLEA 飼料給与中の性周期

21日間 CLEA 飼料を給与した時のマウスの性周期は、Table 2 に示したとおりである。その 77.2%が、4~6 日の間隔で性周期をくりかえした。この時の性周期の長さとは、5.43日であった。残りのマウスでは、休止期が連続して出現したので、以後の実験から除いた。

2. PaA 欠乏症状

a. 外観: PaA 欠乏群においては、50日目ごろより、被毛の粗剛化および立毛、頸部、背部または腹部に顕著な脱毛がみられた。しかしラットでみられるような顔面赤さび色の色素沈着、鼻孔周囲の血液様物付着などの欠乏症状はなかった。

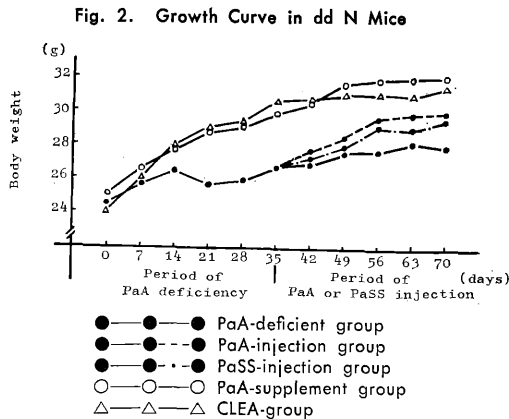
b. 体重の変化: 各群別の体重曲線は、Fig. 2 に示した。

PaA 添加群および CLEA 群は、順調な体重増加を示したのに対し、PaA 欠乏群では、体重増

Table 2. Estrous Cycle of dd N Mice Maintained on CLEA Diet for 21 Days

| | |
|--|------------|
| No. of mice | 92 |
| No. of mice showing a relatively regular cycle (%) | 71 (77.2) |
| Total No. of cycles examined | 172 |
| Mean duration of an estrous cycle (days) | 5.43±0.12* |
| Mean duration of each stage per cycle (days) | |
| Proestrus | 0.73±0.03 |
| Estrus | 1.05±0.04 |
| Metestrus | 0.94±0.03 |
| Diestrus | 2.71±0.11 |

* Mean±standard error.



加の抑制がみられた。これに反し、PaA あるいは PaSS を皮下投与した両群では、体重がやや増加する傾向を示した。

3. PaA 欠乏中の性周期

4~6 日間隔で性周期をくりかえすマウスに、35日間 PaA 欠乏飼料を給与したときの性周期は、Table 3 に示したとおりである。

すなわち、これらのマウスでは、休止期の延長(56.9%)、または持続的発情(15.7%)がみられ、ともに性周期が延長した。

また、これらのマウスのうち、PaA 欠乏飼料を与え始めてから 1 週間以内に性周期の回復がみられたマウス(ただし PaA の欠乏飼料を与えた翌

日から休止期の状態がつづいたマウスは除去した)について、性周期の長さとして 1 性周期中の各期の長さを、PaA 添加群および CLEA 群と比較した。その結果は、Table 4 に示すように、PaA 欠乏マウスの性周期は、6.85日であった。これに対し PaA 添加群および CLEA 群の性周期は、6.15日および6.36日であった。また、1 性周期の各期の長さは、PaA 添加群および CLEA 群の休止期が2.86日および3.38日であるのに対し、PaA 欠乏マウスの休止期は、4.14日と有意に延長した。

4. PaA あるいは PaSS 投与中の性周期

PaA 欠乏によって、性周期が延長したマウスは、さらに継続して PaA 欠乏飼料を給与しつつ、PaA あるいは PaSS を皮下投与した。この35日間における各群の性周期は、Table 5 と Fig. 3 に示した。

すなわち PaA 欠乏群の性周期がもっとも長く、9.22日であったのに対し、PaA 投与群および PaSS 投与群の性周期は、7.29日および7.14日である。とくに PaSS 群の短縮は有意であった。また PaA 添加群および CLEA 群の性周期は、7.30日および7.29日である。したがって、これら 4 群間には、ほとんど差が認められなかった。さらに 1 性周期中の各期の長さは、休止期の長さのみに差があり、PaA 欠乏群の6.87日が有意に長く、他の 4

Table 3. Pattern of Estrous Cycle of dd N Mice Maintained on Pantothenic Acid Deficient Diet for 35 Days

| | |
|------------------------------|-----------|
| No. of mice | 51 |
| Pattern of estrous cycle (%) | |
| Persistent diestrus | 29 (56.9) |
| Persistent estrus | 8 (15.7) |
| Relatively regular cycle | 14 (27.4) |

Table 4. Estrous Cycle of dd N Mice in the Period of Pantothenic Acid Deficiency

| Group | No. of mice | Total No. of cycles examined | Mean duration of an estrous cycle (days) | Mean duration of each stage per cycle (days) | | | |
|----------------|-------------|------------------------------|--|--|-------------|-------------|---------------|
| | | | | Proestrus | Estrus | Metestrus | Diestrus |
| PaA-deficient | 33 | 154 | 6.85 ± 0.03* | 0.79 ± 0.03** | 0.87 ± 0.09 | 1.05 ± 0.04 | 4.14 ± 0.25** |
| PaA-supplement | 10 | 55 | 6.15 ± 0.41 | 1.09 ± 0.06 | 1.09 ± 0.08 | 1.11 ± 0.06 | 2.86 ± 0.31** |
| CLEA | 10 | 53 | 6.36 ± 0.27 | 0.91 ± 0.07 | 1.07 ± 0.06 | 1.00 ± 0.06 | 3.38 ± 0.27** |

* Mean ± standard error.

** Significant difference from the PaA-deficient group (p < 0.05).

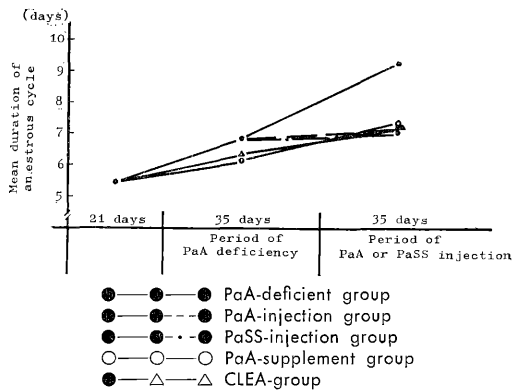
Table 5. Estrous Cycle of dd N Mice in the Period of Injection with Calcium Pantothenate or Pantethine

| Group | No. of mice | Total No. of cycles examined | Mean duration of an estrous cycles (days) | Mean duration of each stage per cycles (days) | | | |
|----------------|-------------|------------------------------|---|---|-----------|-----------|-----------|
| | | | | Proestrus | Estrus | Metestrus | Diestrus |
| PaA-deficient | 10 | 36 | 9.22±0.71* | 0.74±0.08 | 0.79±0.09 | 0.82±0.07 | 6.87±0.69 |
| PaA-injection | 11 | 45 | 7.29±0.82** | 0.85±0.05 | 1.02±0.08 | 0.89±0.05 | 4.53±0.80 |
| PaSS-injection | 12 | 51 | 7.14±0.54** | 0.79±0.06 | 0.92±0.07 | 0.82±0.06 | 4.61±0.53 |
| PaA-supplement | 10 | 43 | 7.30±0.65** | 0.88±0.07 | 1.02±0.09 | 0.94±0.08 | 4.46±0.58 |
| CLEA | 10 | 42 | 7.29±0.68** | 0.92±0.05 | 0.85±0.06 | 0.87±0.07 | 4.65±0.42 |

* Mean±standard error.

** Significant difference from the PaA-deficient group ($p < 0.05$).

Fig. 3. Estrous Cycle of Each Group during Experiment



群では4.46~4.65日で、ほぼ近似した長さであった。

5. 妊娠におよぼす影響

各群の妊娠率は、Table 6 に示したように、PaA 添加群>PaSS 投与群>PaA 投与群>CLEA 群>PaA 欠乏群の順に高い。PaA 欠乏群は、30

%ともっとも低率であった。一方、平均着床数は、PaA 添加群および CLEA 群の 6.3 および 6.8 に対し、PaA 欠乏群では 4.3 と、前二者よりも明らかに減少する傾向がみられた。PaA 投与群および PaSS 投与群の平均着床数は、6.7 および 5.7 であり、PaA 欠乏群より高い値であった。また死亡吸収胎児数は、PaA 欠乏群>PaA 投与群>PaSS 投与群>PaA 添加群>CLEA 群の順に増加がみられた。とくに PaA 欠乏群は 53.8% で、他の 4 群に比べて高率であった。なお PaA 欠乏群の死亡吸収胎児数に対し、他の 4 群では有意に低率であった。さらに PaA 欠乏群では、1 母体に一腹全胎児の浮腫が観察された。すなわち PaA 欠乏は、マウスの妊娠維持能力に大きな障害をきたすことが明らかとなった。一方、PaA および PaSS の投与は、PaA 欠乏による妊娠維持能力の低下に対し、著明な回復効果を有することがわかった。

Table 6. Effects of Pantothenic Acid Deficient Feeding and Injection with Calcium Pantothenate or Pantethine on the Reproductive Performance in dd N Mice

| Group | No. of litters | No. of pregnancy (%) | No. of implants Mean±S.E.* | Dead and resorbed fetuses (%) | Malformed fetuses |
|----------------|----------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------|
| PaA-deficient | 10 | 3 (30.0) | 4.3±1.3 | 53.8 | Edema (one litter) |
| PaA-injection | 11 | 6 (54.5) | 6.7±0.2 | 27.5** | |
| PaSS-injection | 12 | 8 (66.7) | 5.7±0.5 | 17.4** | |
| PaA-supplement | 10 | 7 (70.0) | 6.3±0.6 | 15.9** | |
| CLEA | 10 | 5 (50.0) | 6.8±0.1 | 11.7** | |

Remarks: The mice of each group were given the CLEA diet for three weeks in this study.

* Mean±standard error.

** Significant difference from the PaA-deficient group ($p < 0.05$).

考 察

性周期に対する脂溶性ビタミン A⁶⁾, D^{2,7,14)} および K¹⁾ の影響については、ラットによって比較的多くの実験が行なわれている。すなわち、これらのビタミン欠乏によって性周期は、持続的な発情または休止期に移行するとともに、適量のビタミン投与で、不規則な性周期が回復することが報告されている。B 群ビタミンについては、主として、妊娠中の B 欠乏と胎児の発育に関する実験が多い。しかし性周期については、EVANS, BISHOP らが、ビタミン B の慢性的な欠乏による性周期の不規則化と停止を、また COWARD ら³⁾ が、Thiamine または Riboflavin 欠乏による持続的な休止期が、両ビタミンの投与によって回復することを報告しているに過ぎない。

マウスの性周期は、年齢により変化することが知られている。われわれが実験対照とした PaA 欠乏飼料に PaA を添加した PaA 添加群、および普通飼料を給与した CLEA 群でも、加齢による考えられる性周期の延長と休止期の延長がみられた。これに反し、35日間 PaA 欠乏飼料を給与した PaA 欠乏群では、その約半数に持続的の休止期像を示す例がみられ、対照の 2 群に比べて、休止期が有意に延長した。さらに35日間(計70日間) PaA 欠乏飼料の給与を続けた時の性周期は、Fig. 3 のように、他の群より明らかに延長していた。この時の各期の長さは、休止期のみが約 2 日と有意に長かった。

これに対し、PaA 欠乏飼料給与下で PaA または PaSS を投与した群の性周期には、PaA 添加群および CLEA 群との間にほとんど差が認められず、両薬物による回復効果を示された。

性周期の観察を終えた各群マウスに、CLEA 飼料を給与して行なった妊娠試験の成績では、PaA 欠乏群マウスの妊娠率の低下、着床数の減少、胎児死亡吸収率の増加および異常児(浮腫)の出現がみられた。これに反し、PaA または PaSS を投与したマウスでは、これら妊娠維持能力の回復が認められ、妊娠時における PaA または PaSS の関与と、その重要性がうかがわれた。これに関連して、GIROUD⁴⁾ によると、PaA 欠乏下における妊娠ラットの肝中 PaA 量は、妊娠の経過に伴い次第に減少し、妊娠末期には正常よりも25%低下

するが、16%に低下したとき奇形が起こることを報告している。一方 HURLEY⁵⁾ は正常飼料を与えたモルモット胎児の肝中 PaA 量および CoA 量は、妊娠末期から分娩前後のごく短い期間に、最高量となることを認めている。さらに NELSON ら¹³⁾ は、交配 4~10 日前から妊娠中に PaA 欠乏飼料を与えたラットでは、胎児死亡が増加し、眼の異常、浮腫、口蓋裂、尾の奇形、指の出血、外脳症、水頭症などの外部異常児が出現することを認めている。さらに交配 20 日前から PaA 欠乏状態においた時、100%の胎児死亡がみられたが、妊娠中に PaA 50mg/kg 含有飼料を与えると、胎児は正常に発育したと報告している。

一方、妊娠動物のビタミン欠乏による障害と卵巣ホルモンの投与との関連性については、NELSON ら¹²⁾ が、交配 11~15 日前から妊娠期間をとおして Thiamine 欠乏ラットで、妊娠を維持し得た母動物は、わずか 18% にすぎない。しかし、Estrone 1~3 μg を投与すると 35%、Progesterone 4~6 mg の投与で 80%、Estrone 0.5~1.0 μg と Progesterone 4mg の併用投与で 95% の妊娠維持ができたと報告している。また、B₆ 欠乏ラット^{10,11)} でも同様の報告がみられる。これらの文献から、ビタミン欠乏下の動物では、下垂体、卵巣または胎盤ホルモンの生産・分泌機能の減退が推測される。PaA 欠乏においても、CoA がステロイドホルモン合成に関与するという事実から、ホルモンの不均衡をきたし、生殖機能障害をひき起すことも考えられよう。

前報⁹⁾ のように、PaA または PaSS を強化した飼料を給与したマウスでは、産児数の増加がみられる一方、本実験のように PaA 欠乏飼料を給与すると、着床数の減少と胎児死亡吸収数の増加とが認められた。この点については、排卵数と着床数の減少との両面が考えられるので、将来、卵巣変化を経時的、組織学的に検討し、その関係を明らかにする考えである。

結 論

ddN マウスの性周期と妊娠におよぼすパントテン酸 (PaA) 欠乏の影響を検討するとともに、それらに対する PaA およびパントテン (PaSS) の回復効果を追求した結果、つぎの結論を得た。

- 1) PaA 欠乏 マウスでは、性周期の延長がみ

られ、また休止期が有意に延長した。

2) PaA 欠乏マウスでは、着床数の減少と胎児死亡吸収率の有意な増加がみられた。

3) これらの諸変化に対し、PaA および PaSS には、同程度の回復効果が認められた。

終わりに当たり、本研究の発表を許可された第一製薬株式会社社長石黒武雄博士、研究開発部長宮武一夫博士、終始ご鞭撻下さった総合研究所長清水正夫博士に深謝する。

本論文の要旨は、1968年8月、第66回日本獣医学会において発表した。

文 献

- 1) 阿部 (1965): ビタミン, **32**, 535~550.
- 2) 茅根 (1958): ビタミン, **14**, 356~362.
- 3) COWARD, K. H., MORGAN, B. G. E. and WALLER, L. (1942): *J. Physiol.*, **100**, 423~431.
- 4) GIROUD, A., BOISSELOT-LEFEBVRES, J. and DUPUIS, R. (1961): *Bull. Soc. chim. Biol.*, **43**, 859~864.
- 5) HURLEY, L. S. (1967): *J. Nutr.*, **91**, 27~38.
- 6) 伊藤 (1966): 日本不妊会誌, **11**, 93~109.
- 7) 工藤 (1969): ビタミン, **39**, 402~427.
- 8) 森田・大森・大島 (1968): 日本獣医学雑誌, **30**, 317~322.
- 9) NELSON, M. M. and EVANS, H. M. (1946): *J. Nutr.*, **31**, 497~507.
- 10) NELSON, M. M., LYONS, W. R. and EVANS, H. M. (1951): *Endocrinology*, **48**, 726~732.
- 11) NELSON, M. M., LYONS, W. R. and EVANS, H. M. (1953): *Endocrinology*, **52**, 585~589.
- 12) NELSON, M. M. and EVANS, H. M. (1955): *J. Nutr.*, **55**, 151~164.
- 13) NELSON, M. M., WRIGHT, H. V., BAIRD, C. D. C. and EVANS, H. M. (1957): *J. Nutr.*, **62**, 395~405.
- 14) 大庭 (1961): ビタミン, **22**, 68~84.

BIOLOGICAL STUDIES ON PANTETHINE
VIII. INFLUENCE OF DRUGS ON ESTROUS CYCLE AND
REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN PANTOTHENIC
ACID DEFICIENT MICE

Haruka MORITA, Yoji ÔMORI and Yasuo ÔSHIMA

Biological Research Laboratory of Research Laboratories, Daiichi Seiyaku Co., Ltd., Tokyo

(Received for Publication September 13, 1969)

Calcium pantothenate and pantethine were investigated for influence on the estrous cycle and reproductive performance in mice deficient in pantothenic acid. Female mice of the dd N strain, 40 days of age, were placed on control diets (CLEA, CA-1) for 21 days. Only those which had exhibited at least 2 regular cycles of 4, 5, or 6 days each during this period were used (Table 2). As shown in Fig. 1, they were divided into 5 groups.

1) The estrous cycle and diestrous stage per cycle were prolonged by feeding on diets deficient in pantothenic acid for 70 days (Table 5).

2) There was a tendency to decrease in implantation and increase in incidence of fetal mortality among mice given CLEA diets deficient in pantothenic acid for three weeks (Table 6).

3) The decline in sexual function caused by feeding on a pantothenic acid deficient diet was improved by subcutaneously injection with calcium pantothenate and pantethine (Tables 5 and 6).