

パワースペクトル解析(最大エントロピー法)による牛血漿中成長ホルモンおよびプロラクチン分泌リズム解析方法の検討

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本畜産學會報 = The Japanese journal of zootechnical science |
| ISSN | 1346907X |
| 著者 | 小木野, 瑞奈 松浦, 晶央 山崎, 淳 入交, 眞巳 櫛引, 史郎 新宮, 博行 粕谷, 悦子 甫立, 孝一 |
| 巻/号 | 83巻1号 |
| 掲載ページ | p. 35-46 |
| 発行年月 | 2012年2月 |

パワースペクトル解析（最大エントロピー法）による牛血漿中 成長ホルモンおよびプロラクチン分泌リズム解析方法の検討

小木野瑞奈¹・松浦晶央¹・山崎 淳¹・入交眞巳¹・
櫛引史郎²・新宮博行²・粕谷悦子³・甫立孝一¹

¹ 北里大学獣医学部，十和田市 034-8628

² 畜産草地研究所，つくば市 305-0901

³ 農業生物資源研究所，つくば市 305-0901

(2011. 5. 17 受付, 2011. 9. 30 受理)

要 約 パワースペクトル解析における最大エントロピー法 (MEM) によるホルモン分泌リズム解析時の適切な測定条件を検討した。ウシ血漿中成長ホルモン (GH) およびプロラクチン (PRL) 濃度の測定データを用いて同季節，同個体内の異なるサンプリング間隔および回数における MEM 検出周期を比較した。その結果，GH や PRL のように短時間の周期 (ウルトラディアンリズム) と長時間の周期 (あるいはサーカディアンリズム) が同時に存在するホルモンの分泌リズムを解析する場合には，15 分間隔など短いサンプリング間隔の測定値で解析し，回数を上げて短時間の周期と同時に長時間周期の検出も検討する手段が最適であるが，30 分間隔の測定値で解析した場合でも 15 分間隔の測定値で解析した場合とほぼ同様の結果が得られること，15 時間以上の長時間の周期を含むリズムを検討する場合には，30 時間以上の連続したサンプリングが必要であることが分かった。

日本畜産学会報 83 (1), 35-46, 2012

近年，Period や Cry など哺乳類の時計遺伝子の同定やクローニングが次々と行われたのを始まりとして (Tei ら 1997 ; Kume ら 1999)，生体リズム (Biological Rhythm) に関する研究は目覚ましく進展している。生体リズムに関する知見を得ることは，家畜の健康や生産機能を制御する上でも重要である。例えば，ヒツジやヤギなどの季節繁殖性の家畜や産卵鶏にとって，光周期は生産性に影響する重要な環境リズムであり (Karsch ら 1984 ; Ernst 1989)，それに同調した生体のメラトニン (MEL) 分泌リズムや発情周期などを知ることは農家の利益につながる。また，泌乳牛においては，長日条件下において乳量が増加することが知られているが，これは MEL やプロラクチン (PRL)，インスリン様成長因子-1 (IGF-1)，成長ホルモン (GH) を介することが推測されており (Peters ら 1978 ; Tucker と Ringer 1982 ; Dahl ら 2000)，これらのホルモン分泌リズムを知ることは乳生産の制御に役立つと考えられる。しかし，家畜における生体リズムに関する研究報告は少ない。そこで著者らは，ウシを用いて様々な飼育環境に適応した状態における生体リズムの検出を試みる研究を進めている。

リズム解析手法には様々ある。例えば GH などのホル

モン分泌解析にはパルサー解析がよく用いられるが，パルサー解析では大きなピークしか拾うことができない。また，血中ホルモン濃度や心拍数，血圧の日内変動など生理学や医学分野における時系列データの解析手法としてよく用いられるものにコサイナー法 (Cosinor Method : Nelson ら 1979) があるが，コサイナー法は周期値として単一の周期値 (24 時間) を前提にするものであり，時系列データが多重周期構造を持つ場合には，正しくその周期構造を抽出することができないという問題点が指摘されている (大友と田中 1992)。そこで著者らはスペクトル解析に着目した。スペクトル解析は基本的に，ある時間数隔たった二つの同じ変動の相関を表す，自己相関関数を用い (隔たり時間をラグまたは回数と呼ぶ)，周期性を求める解析方法である。スペクトル解析の代表的な手法に高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform : FFT) があるが，最大エントロピー法 (Maximun Entropy Method : MEM) は FFT に比較してスペクトルの分解能，安定性，短いデータからのスペクトル計算などにおいて有意性を持つことが知られている (日野 2010)。また，MEM はその分解能により多重周期構造を解析できるため，細かい周期を検出できないというパルサー解析やコサイナー法

連絡者：甫立孝一 (fax : 0176-23-8703, e-mail : mkhodate@vmas.kitasato-u.ac.jp)

における問題点を回避している。このような点から MEM は、血中ホルモン濃度などの非線形時系列データの解析手法として優れていると考えられた。しかし、MEM での解析時にもいくつか考慮すべき点がある。それは、測定期間および測定間隔の影響と（米山ら 1992）、次数（ラグ）選択の影響（すなわち、どこで相関を打ち切るか）である（寺池 1992）。例えば、Ulrych と Bishop（1975）はデータ数が比較的少数の時には観測データ数の 1/2 程度を次数として採用することを提案しているが、このような報告は研究対象の解析の過程で経験的或いは結果的に有効であったものとして報告されたものであり、GH や PRL などホルモン分泌リズムの解析に適用できるかどうかは不明である。そこで、本実験では、ウシ血漿中 GH および PRL 濃度の測定データを用いて、数種類の次数および測定間隔における MEM によるパワースペクトル解析を行い、適切な次数、測定間隔および測定期間を検討した。

材料および方法

本実験はすべて北里大学獣医学部動物実験・倫理委員会の承認を得て行った。

1. 供試動物

4.5 ± 1.5 カ年（平均値 ± 標準偏差）の日本短角種成雌牛 4 頭（476 ± 37.6 kg）を用いた。ウシの飼育方法は、本学部附属農場における飼育方法に従い、繋ぎ飼いで、乾草およびサイレージを 1 日 2 回（9:30 および 16:00）給与した。水とミネラルブロックは自由摂取とした。

2. 試験方法

試験期間は、春分（2004 年 3 月 20～21 日）、夏至（2003 年 6 月 23～24 日）、秋分（2003 年 9 月 23～24 日）、冬至（2003 年 12 月 22～23 日）の各 24 時間であった。血液は、

実験前日に供試牛の頸静脈に装着したカテーテルより、実験開始時刻 12:00 から翌日の実験終了時刻 12:00 までの 24 時間、15 分ごとにヘパリン入り試験管に 25 mL を採取した。夜間は常に点いている 2 lux 以下の照明の下、日中と同様に採血を行った。血液はすぐに氷冷し、遠心分離（3000 rpm, 4°C, 30 分）により血漿を得て、分析まで -30°C に保存した。

3. 血漿 GH および PRL 濃度の測定

血漿 GH 濃度は Jhoke（1978）の方法に従い、標準物質にはウシ GH（NIH-GH-B12）、抗体はカニクイザル抗血清を用いて二抗体法の RIA により測定した。PRL 濃度は Jhoke（1969）の方法に従い、標準物質はウシ PRL（NIH-P-B2）、抗体はモルモット抗血清を用いて二抗体法の RIA により測定した。GH および PRL の測定内変動係数はそれぞれ 7.0% および 8.0% であり、すべて一度の測定で行った。

4. パワースペクトル解析

時系列データのパワースペクトル解析とは、時系列データに含まれている変動の周波数とそのパワー分布を算出することにより、時系列データを構成する周期性の成分を明らかにする手法のことである（常盤野ら 2008）。

解析ソフト Kyplot 5.0（カイエンス、東京）を用いて算出された周波数のパワー分布はパワースペクトル密度（Power Spectral Density）により表され（図 1）、パワースペクトル密度のピーク部分の周波数（Frequency: f ）から、周期（Cyclic hour: T ）を求める。 f と T の関係式は、 $T = 1/f$ である。具体例を示すと、図 1 は、個体 N0103 における春分、15 分間隔データ、次数 10 で求めたパワースペクトル密度である。この時のピークにあたる f は 0.56 なので、公式に当てはめると $T = 1/0.56$ となり、周期 T は 1.78 時間となる（表 1）。

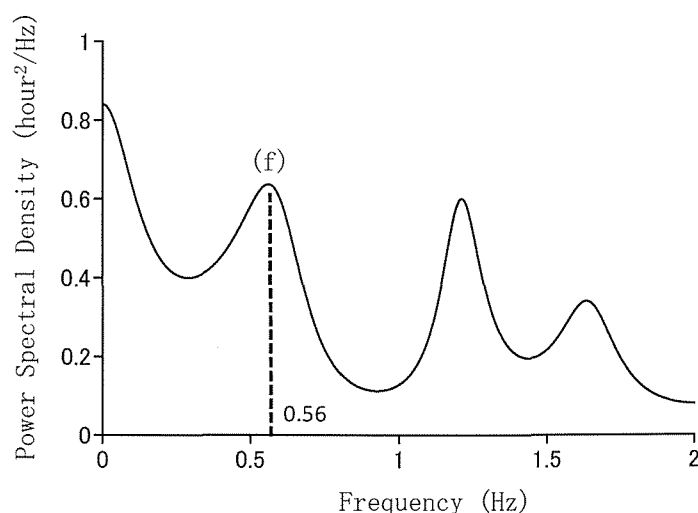


Figure 1 Power spectral density of GH data collected every 15 minutes in cattle N0103 in spring, 2004. The peak of frequency obtained was 0.56.

ホルモン分泌リズム解析法の検討

Table 1 Frequency, spectral density and cycle (hr) of plasma growth hormone secretion rhythm in each season (Cattle No. N0103)

| Season | Sampling interval | Lag | Frequency | Spectral density | Cycle (hr) | |
|--------|-------------------|----------------|-----------|------------------|------------|------|
| Spring | 15 min | 5 | 0.28 | 0.59070 | 3.58 | |
| | | 10 | 0.56 | 0.63690 | 1.78 | |
| | | 20 | 0.46 | 0.75341 | 2.15 | |
| | | 25 | 0.46 | 0.75982 | 2.16 | |
| | | 30 | 0.04 | 1.23745 | 25.21 | |
| | | 48 | 0.04 | 4.25632 | 25.39 | |
| | 30 min | 5 | 0.43 | 1.38650 | 2.34 | |
| | | 10 | 0.45 | 1.23491 | 2.24 | |
| | | 20 | 0.36 | 1.77584 | 2.75 | |
| | | 24 | 0.35 | 2.84509 | 2.83 | |
| | 1 hr | 5 | 0.41 | 3.69979 | 2.43 | |
| | | 10 | 0.36 | 4.49057 | 2.79 | |
| | | 12 | 0.46 | 5.17406 | 2.17 | |
| | Summer | 15 min | 5 | 0.90 | 0.49633 | 1.11 |
| | | | 10 | 0.38 | 0.26757 | 2.64 |
| 20 | | | 0.85 | 0.61078 | 1.17 | |
| 25 | | | 0.05 | 1.48740 | 19.70 | |
| 30 | | | 0.05 | 1.51188 | 19.02 | |
| 48 | | | 0.05 | 4.50934 | 21.59 | |
| 30 min | | 5 | 0.42 | 0.34247 | 2.39 | |
| | | 10 | 0.07 | 0.95146 | 13.84 | |
| | | 20 | 0.40 | 1.15188 | 2.49 | |
| | | 24 | 0.04 | 3.76518 | 24.78 | |
| 1 hr | | 5 | 0.07 | 1.32074 | 15.16 | |
| | | 10 | 0.05 | 2.27409 | 20.54 | |
| | | 12 | 0.05 | 3.14299 | 21.30 | |
| Autumn | | 15 min | 5 | 0.78 | 2.49302 | 1.29 |
| | | | 10 | 0.78 | 4.20822 | 1.28 |
| | 20 | | 0.76 | 3.94581 | 1.32 | |
| | 25 | | 0.84 | 4.30805 | 1.20 | |
| | 30 | | 0.04 | 8.13724 | 23.33 | |
| | 48 | | 0.71 | 30.26183 | 1.42 | |
| | 30 min | 5 | 0.78 | 9.76815 | 1.29 | |
| | | 10 | 0.78 | 8.98588 | 1.29 | |
| | | 20 | 0.05 | 22.46844 | 20.37 | |
| | | 24 | 0.79 | 68.84642 | 1.27 | |
| | 1 hr | 5 | 0.21 | 29.41962 | 4.85 | |
| | | 10 | 0.19 | 55.36233 | 5.34 | |
| | | 12 | 0.19 | 57.82505 | 5.23 | |
| | Winter | 15 min | 5 | 0.68 | 0.10453 | 1.48 |
| | | | 10 | 0.64 | 0.15241 | 1.57 |
| 20 | | | 0.68 | 0.28416 | 1.47 | |
| 25 | | | 0.12 | 0.74353 | 8.31 | |
| 30 | | | 0.67 | 0.99606 | 1.49 | |
| 48 | | | 0.04 | 10.65958 | 26.51 | |
| 30 min | | 5 [†] | | | | |
| | | 10 | 0.01 | 0.63408 | 72.10 | |
| | | 20 | 0.04 | 1.37332 | 23.56 | |
| | | 24 | 0.04 | 14.60087 | 25.12 | |
| 1 hr | | 5 | 0.12 | 0.54169 | 8.35 | |
| | | 10 | 0.12 | 0.65085 | 8.03 | |
| | | 12 | 0.13 | 0.93606 | 7.81 | |

[†] : Peak of power spectral density was not detected.

解析法は、MEM と設定し、最も高いピークを採択して関係式より周期（時間）を算出した。

同季節、同個体内の各サンプリング時間（15分、30分、1時間）、各次数（5、10、12、20、24、25、30、48）における検出周期を比較した。

結 果

1. GH の分泌リズム

傾向がどの個体でも同様であったため代表値として、個体 N0103 における血漿 GH 濃度の変動を図 2 に示した。表 1 に同季節、同個体内（N0103）の各サンプリング時間（15分、30分、1時間）、各次数（5、10、12、20、24、25、30、48）における検出周期を示した。

本実験結果においては、検出された周期（スペクトル密度が最高値のもの）は、多くが 1~2 時間周期であった。図 2 においても、ピークはどの季節でも 1~2 時間おきにみられた。

15 分間隔の測定値で解析した結果（表 1）、次数 20 以下のとき、1 時間前後の周期を検出することができたが、次数を 20 以上に上げると、10 時間以上の長時間の周期が検出される場合が多くなった。しかし、次数 20 以上の場合は、長時間の周期と同時に、1 時間前後の短時間の周期も検出できた。

30 分間隔の測定値で解析した結果（表 1）、1 時間以下の周期の検出はできないものの、15 分間隔の測定値で解析した場合に検出された短時間の周期（1.5 時間前後の周期）をほぼ表している値が検出された（冬至の値を除く）。ただし、周期が 1 時間以下であった場合は、それも 1.5 時間前後の周期としてしか検出できない。15 分間隔の測定値での解析時と同様、次数を上げると 10 時間以上の長時間の周期が検出され、15 分間隔での解析よりも低い次数で長時間の周期が検出される場合が多くなった。ただし、このときも同時に 1.5 時間前後の短時間の周期が検出できるため、30 分間隔の測定値での解析では、10~20 程度の次数で 1.5 時間前後の短時間の周期と、10 時間以上の長時間の周期が検出されることが分かった。

1 時間間隔の測定値で解析した結果では（表 1）、低い次数であっても 10 時間以上の長時間の周期を検出してしまう場合が多くなり、1 時間前後の短時間の周期は全く検出できなかった。一方、春分の値のように、15 分間隔の測定値で解析した時に検出された周期が例えば 2~3 時間程度の周期の場合は、1 時間間隔の測定値で解析しても同様に 2~3 時間の周期が検出できた。

2. PRL の分泌リズム

PRL は季節ごとおよび個体ごとに変動が異なったため、各季節の代表個体 2 頭における血漿 PRL 濃度の変動を図 3 に示した。表 2 に春分、表 3 に夏至、表 4 に秋分、表 5 に冬至のそれぞれ同個体内の各サンプリング時

間（15分、30分、1時間）、各次数（5、10、12、20、24、25、30、48）における検出周期を示した。

図 3 に示した本実験の結果における PRL の濃度変動は、全季節を通じて多くの個体が 2~4 時間周期の振幅を繰り返して推移していた。春分および夏至では日没後より振幅が増大し、12:00 以前には減少して元に戻る変動を示す個体が多くみられた。秋分は、1 日を通して振幅が小さかった。冬至における個体 N7101 は 2:00 頃から 7:00 頃までの振幅が増大しており、個体 N0102 においても上昇濃度は小さいが、個体 N7101 と同様の傾向がみられた。また、冬至における個体 N0102 と N7101 では、1~2 時間の短時間周期の振幅が同時にみられた。

以下に季節ごとの結果を示す。

春分は、4 頭ともに 2~4 時間周期の振幅がグラフでも確認できた。図 3 および表 2 には、代表的な個体 N0102 および N0103 の結果を表している。15 分間隔の測定値で解析した結果（表 2）、おおよその個体で次数 25 以下であれば短時間周期のリズムが検出できたが、次数を 25 以上に上げた場合は、多くの個体で 10 時間以上の長時間周期のリズムが検出された。しかし、次数 25 以上の場合は、長時間周期と同時に 2~4 時間の短時間周期も検出できた。

30 分間隔の測定値で解析した結果は 15 分間隔の測定値で解析した結果と同様の傾向であった（表 2）。しかし、次数 10 以上の場合に、多くの個体で長時間の周期を検出した。

1 時間間隔の測定値で解析した場合、2 時間以上の周期であっても短時間の周期は殆ど検出することができなかった（表 2）。

夏至のデータ（代表例は個体 N0102 および個体 0103）を解析した結果（表 3）は春分と同様の傾向であったが、夏至では春分よりも振幅する周期が短く、それが 2 時間以下である個体（N0103）がいた。それ以外の個体は検出された周期のほとんどが 10 時間前後であった。

秋分は、全体的に濃度が低く、代表的な個体 N0102 および N7101 において検出されたピークは、15 分間隔および 30 分間隔の測定値で解析した場合において、次数の低い時に 1 時間前後、次数を上げると 10 時間以上、あるいは 24 時間程度の周期までスペクトル密度の高いピークとして検出された。（表 4）。大きな上昇がみられなかったため、10 時間以上の長時間の周期は検出されにくいと考えられたが、いずれのサンプリング間隔の測定値を用いた場合でも、次数を上げると 10 時間以上、あるいは 24 時間程度の周期までスペクトル密度の高いピークとして検出された。1 時間間隔の測定値で解析した場合、短い周期は検出されず、20 時間以上の周期のみが検出された。

冬至のデータでは、グラフをみると、代表的な個体 N0102 および N7101 において 1~2 時間周期の振幅がみら

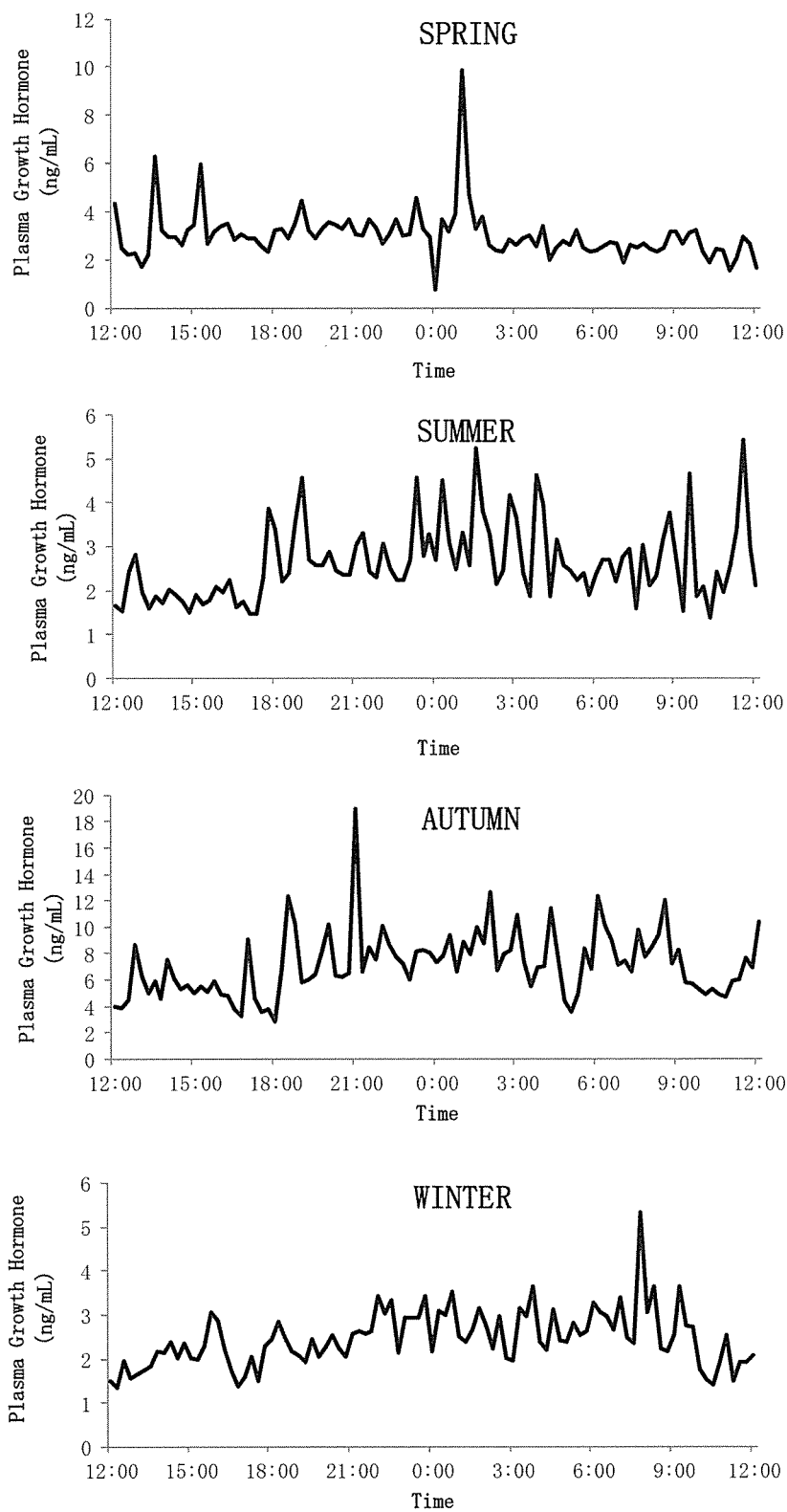


Figure 2 Change in concentration of plasma growth hormone in cattle No. N0103 in summer, autumn and winter of 2003, and in spring of 2004.

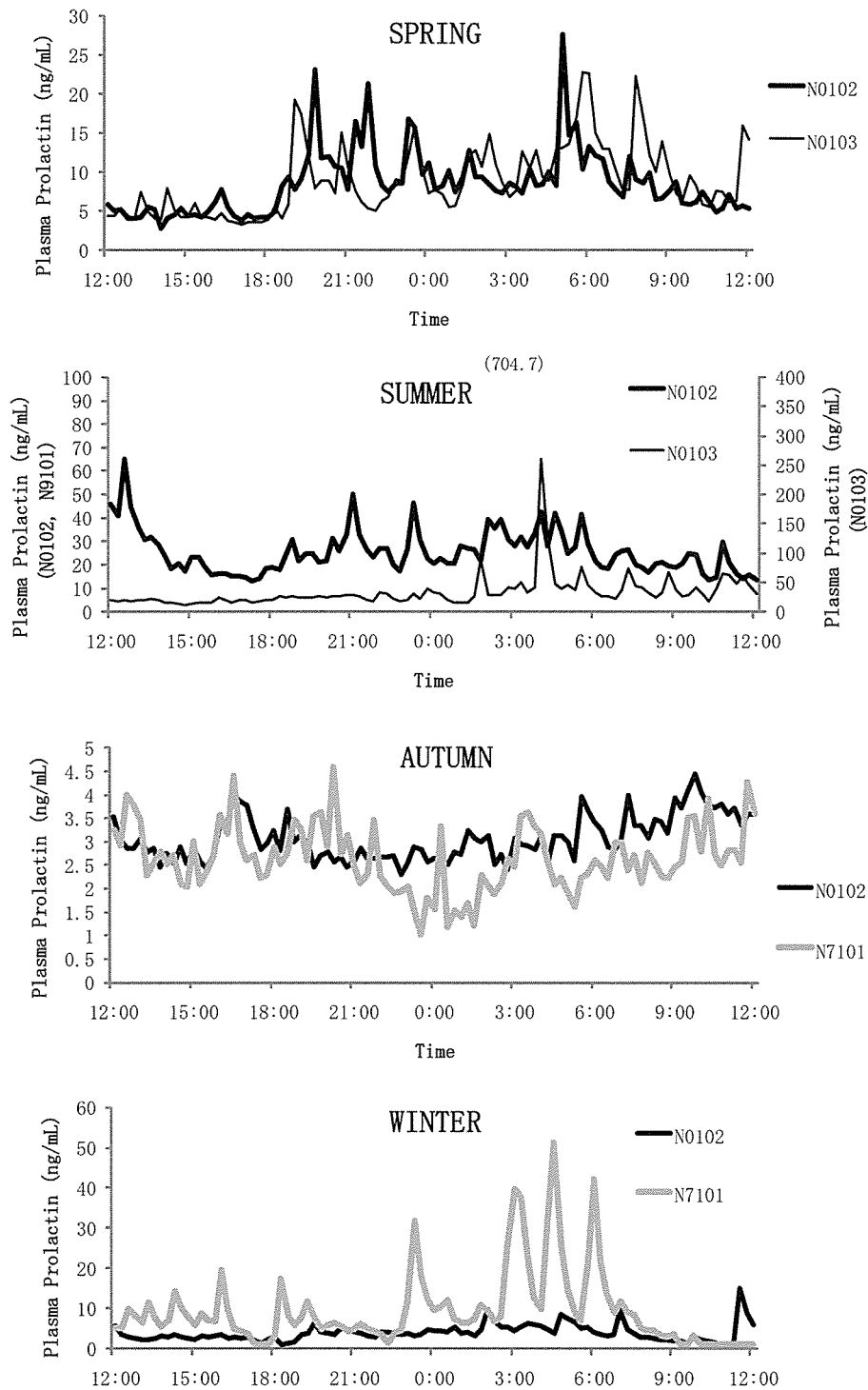


Figure 3 Change in concentration of plasma prolactin in cattle No. 0102 and N0103 in spring of 2003, in autumn of 2004 and in cattle No. 0102 and N7101 in autumn and winter of 2004.

れたが(図3), スペクトル解析の結果, 15分間隔の測定値における解析でも次数を20以上に上げると, もっと長時間周期のピークがスペクトル密度の高いピークとして検出された(表5). しかし, 次数を上げた場合も, 長時間周期と同時に1~2時間の短時間周期のピークも検

出されている. 30分間隔の測定値における解析は, 15分間隔の測定値における解析と同様であった. 1時間間隔の測定値における解析では, 1~2時間の短時間周期のピークは全く検出されなかった. しかし, 2~3時間の周期であれば検出できた.

Table 2 Frequency, spectral density and cycle (hr) of plasma prolactin secretion rhythm in cattle N0102 and N0103 in spring

| Cattle | Sampling interval | Lag | Frequency | Spectral density | Cycle (hr) | |
|--------|-------------------|----------------|-----------|------------------|------------|------|
| N0102 | 15 min | 5 [†] | | | | |
| | | 10 | 0.55 | 6.63308 | 1.82 | |
| | | 20 | 0.06 | 48.42030 | 15.95 | |
| | | 25 | 0.06 | 59.34450 | 15.95 | |
| | | 30 | 0.06 | 66.58607 | 16.24 | |
| | 30 min | 48 | 0.04 | 597.21538 | 22.39 | |
| | | 5 [†] | | | | |
| | | 10 | 0.54 | 13.11059 | 1.84 | |
| | | 20 | 0.06 | 79.72372 | 15.74 | |
| | 1 hr | 24 | 0.04 | 327.72481 | 22.96 | |
| | | 5 | 0.30 | 28.47030 | 3.34 | |
| | | 10 | 0.05 | 111.70468 | 20.42 | |
| | | 12 | 0.04 | 440.34737 | 23.52 | |
| | N0103 | 15 min | 5 | 0.94 | 4.39991 | 1.06 |
| | | | 10 | 0.44 | 10.37792 | 2.26 |
| 20 | | | 0.03 | 57.88012 | 28.96 | |
| 25 | | | 0.48 | 23.82248 | 2.09 | |
| 30 | | | 0.03 | 68.04045 | 29.07 | |
| 30 min | | 48 | 0.03 | 156.05387 | 32.48 | |
| | | 5 | 0.45 | 12.05035 | 2.25 | |
| | | 10 | 0.05 | 54.17828 | 20.42 | |
| | | 20 | 0.46 | 135.48648 | 2.16 | |
| 1 hr | | 24 | 0.46 | 213.29384 | 2.16 | |
| | | 5 | 0.04 | 62.70702 | 28.55 | |
| | | 10 | 0.09 | 95.10596 | 11.23 | |
| | | 12 | 0.46 | 280.69643 | 2.17 | |

[†]: Peak of power spectral density was not detected.

考 察

1. GHの分泌リズム

ウシにおいて血中GHは偶発的な分泌動態を示すことが知られており、多くの論文でGH分泌に周期的なリズムは無いと報告されている(MollettとMalven 1982; Breierら1986; Wheatonら1986; Ozawaら1991; PlouzekとTrenkle 1991)。しかし、GH分泌がパルス状であるという結果も多くの動物種、例えば、ラット(TannenbaumとMartin 1976)、ヤギ(Mogiら2002; Yonezawaら2005)、ヒト(Finkelsteinら1972)、サル(Wollerら2002)、ブタ(Driskoら1998)などで報告されている。ウシにおいてもGH分泌の周期性を報告している論文がみられる(Hanninenら2006; Kasuyaら2012)。しかし、これらの実験におけるサンプリング間隔および検出されたウルト

ラディアンリズムは本実験結果よりも長い。例えばHanninenら(2006)の報告では、サンプリングは20分間隔で、検出された周期は6時間、Kasuyaら(2012)の報告では、サンプリングは1時間間隔で、検出された周期は5.7時間であった。Lefcourtら(1995)は、15分間隔、48時間にわたるサンプリングの結果、ウシGHに1.5時間周期のウルトラディアンリズムとサーカディアンリズムの存在を示しており、Borromeoら(1994)は、15分間隔24時間にわたるサンプリングデータのスペクトル解析の結果、7.5および1.9時間周期のウルトラディアンリズムが存在したと報告している。すなわち、これまでの報告では、サンプリング間隔の長さによって検出された周期が異なっていると言える。

本実験に用いたパワースペクトル解析法は、例えば24時間周期があることを前提としたコサイナー法や、大き

Table 3 Frequency, spectral density and cycle (hr) of plasma prolactin secretion rhythm in cattle N0102 and N0103 in summer

| Cattle | Sampling interval | Lag | Frequency | Spectral density | Cycle (hr) | |
|--------|-------------------|----------------|-----------|------------------|------------|-------|
| N0102 | 15 min | 5 [†] | | | | |
| | | 10 | 0.04 | 122.55542 | 27.31 | |
| | | 20 | 0.10 | 373.62106 | 9.73 | |
| | | 25 | 0.11 | 380.59955 | 9.10 | |
| | | 30 | 0.09 | 277.17144 | 11.74 | |
| | 30 min | 48 | 0.07 | 603.61905 | 15.21 | |
| | | 5 | 0.69 | 23.51039 | 1.46 | |
| | | 10 | 0.10 | 381.06624 | 9.70 | |
| | | 20 | 0.07 | 1235.82647 | 14.84 | |
| | 1 hr | 24 | 0.07 | 1637.06280 | 15.15 | |
| | | 5 | 0.10 | 255.20106 | 9.78 | |
| | | 10 | 0.07 | 376.32840 | 14.54 | |
| | N0103 | 15 min | 12 | 0.06 | 798.66838 | 16.44 |
| | | | 5 | 0.75 | 489.30881 | 1.33 |
| | | | 10 | 0.52 | 593.60365 | 1.92 |
| 20 | | | 0.86 | 698.52934 | 1.16 | |
| 25 | | | 0.86 | 932.76703 | 1.16 | |
| 30 min | | 30 | 0.11 | 1450.46652 | 8.81 | |
| | | 48 | 0.03 | 5281.46624 | 30.29 | |
| | | 5 | 0.66 | 1349.52290 | 1.52 | |
| | | 10 | 0.56 | 1303.84958 | 1.79 | |
| 1 hr | | 20 | 0.14 | 3076.68301 | 7.20 | |
| | | 24 | 0.04 | 4481.62897 | 26.80 | |
| | | 5 | 0.11 | 5065.30487 | 9.20 | |
| | | 10 | 0.15 | 7374.17257 | 6.57 | |
| | | 12 | 0.05 | 8597.85540 | 20.87 | |

[†]: Peak of power spectral density was not detected.

なパルスのみを検出するパルサー解析と異なり、変動に含まれる周期をすべてスペクトル密度のピークとして検出する方法であるため、コサイナー法やパルサー解析では検出できない周期も検出できた可能性がある。また、本実験における最短のサンプリング間隔は15分であり、これまでの報告の中でも比較的短い間隔であることから、1時間前後の短い周期が検出できた可能性がある。

また、ウシにおいてGHは夜間に上昇することが報告されており (Kasuyaら2008)、本結果においても、1~2 ng/mL程度であるが、基礎値が夜間に上昇する傾向がみられた。この傾向は、今回GHの測定値を用いてパワースペクトル解析の結果検出された10時間以上の長時間の周期に相当するものと考えられる。

しかし、スペクトル解析では、一般的に1/サンプリング時間×2 Hz以上の周波数帯は精度が低くなるといわ

れており、24時間のサンプリングの場合、検出された周期が12時間を超えると精度が低いこととなる。従って、今回のGHの測定値においては、次数を上げた時に検出される10時間以上の長時間の周期は精度が低い可能性があるため、15分間隔の測定値で解析した結果では、次数20以下で得られた結果が妥当であると考えられる。

次数の決定について、赤池によって提唱された Final Prediction Error (最終予測誤差: FPE) および An Information Criterion (AIC) を判定の根拠として、最適次数 m の見積もりを、 $m < (2\sim 3) \sqrt{N}$ (N: サンプリング数) の範囲内とすることが有効であるとする報告がある (日野2010)。本実験における各サンプリング間隔でのサンプリング数 N および日野 (2010) の公式を用いて求めた最適次数 m の推定値は、15分間隔で N = 97, $m < 20\sim 30$, 30分間隔で N = 49, $m < 14\sim 21$, 1時間間隔で N

Table 4 Frequency, spectral density and cycle (hr) of plasma prolactin secretion rhythm in cattle N0102 and N7101 in autumn

| Cattle | Sampling interval | Lag | Frequency | Spectral density | Cycle (hr) | |
|--------|-------------------|----------------|-----------|------------------|------------|-------|
| N0102 | 15 min | 5 [†] | | | | |
| | | 10 | 0.52 | 0.06257 | 1.92 | |
| | | 20 | 0.47 | 0.10872 | 2.11 | |
| | | 25 | 0.45 | 0.16483 | 2.24 | |
| | | 30 | 0.04 | 0.96586 | 22.96 | |
| | 30 min | 48 | 0.04 | 3.71821 | 24.03 | |
| | | 5 | 0.52 | 0.11549 | 1.93 | |
| | | 10 | 0.48 | 0.11103 | 2.09 | |
| | | 20 | 0.05 | 1.35965 | 21.98 | |
| | 1 hr | 24 | 0.04 | 3.32382 | 23.64 | |
| | | 5 | 0.04 | 0.56119 | 23.99 | |
| | | 10 | 0.05 | 1.63426 | 21.62 | |
| | N7101 | 15 min | 12 | 0.04 | 7.80930 | 23.00 |
| | | | 5 | 1.45 | 0.05802 | 0.69 |
| | | | 10 | 1.36 | 0.20070 | 0.73 |
| 20 | | | 0.08 | 1.18005 | 12.02 | |
| 25 | | | 0.08 | 0.87329 | 12.39 | |
| 30 min | | 30 | 0.09 | 0.82588 | 11.74 | |
| | | 48 | 0.05 | 4.55225 | 20.72 | |
| | | 5 | 0.71 | 0.09550 | 1.40 | |
| | | 10 | 0.06 | 1.10320 | 16.13 | |
| 1 hr | | 20 | 0.05 | 2.76071 | 19.92 | |
| | | 24 | 0.05 | 12.11709 | 22.12 | |
| | | 5 | 0.05 | 1.39619 | 20.08 | |
| | | 1 | 0.05 | 4.49855 | 21.08 | |
| | | 12 | 0.05 | 8.41817 | 21.95 | |

[†]: Peak of power spectral density was not detected.

= 25, $m < 10 \sim 15$ であった。このことは本実験における結果を支持するものであり、さらに、この公式を用いて具体的な次数を決定することができると考えられる。

また、MEMは24時間程度の観測データを用いれば、48時間程度の観測データから得られるのと同等の基本変動を効率よく抽出しうるとの報告がある(米山ら1992)。本実験における実データの解析結果から判断すると、検出された周期が最長で20時間以下という個体が多かったことから、GHのように夜間に上昇するなど、長時間周期のリズム或いはサーカディアンリズムを検討する場合には、少なくとも24時間の倍である48時間にわたる連続したサンプリングが必要であると考えられる。

2. PRLの分泌リズム

ウシにおいて血中PRL濃度には季節変動がみられ(Johke 1978; MarcekとSwanson 1984)、その要因とし

て環境温度および日長時間の違いが相乗的に作用することが考えられている(Johkeら1982; Borromeoら1994; Choら1998)。Borromeoら(1994)は、ウシPRL濃度の変動には夏に濃度が高くなるサーカニユアルリズムがあることを示しており、夏に濃度が高い要因として、ピークの頻度増加と振幅の増大および周期成分の数と頻度の増加を挙げている。また、季節変動に加えてウシPRL濃度には、サーカディアンリズムがあることも報告されている(Koprowskiら1972; Febryら1984)。スペクトル解析を用いて変動を解析した報告には、24時間周期のサーカディアンリズムおよび6時間周期のウルトラディアンリズムの検出(MollettとMalven 1982)、および冬は24時間周期だが、夏には7.2および2.4時間周期のリズムが検出されたことが示されている(Borromeoら1994)。すなわち、ウシ血中PRLの分泌動態には、サーカニユア

Table 5 Frequency, spectral density and cycle (hr) of plasma prolactin secretion rhythm in cattle N0102 and N7101 in winter

| Cattle | Sampling interval | Lag | Frequency | Spectral density | Cycle (hr) | |
|--------|-------------------|--------|-----------|------------------|------------|------|
| N0102 | 15 min | 5 | 0.66 | 2.37412 | 1.52 | |
| | | 10 | 0.57 | 3.47908 | 1.76 | |
| | | 20 | 0.14 | 8.89146 | 6.99 | |
| | | 25 | 0.08 | 12.38873 | 13.21 | |
| | | 30 | 0.44 | 11.39920 | 2.28 | |
| | | 48 | 0.05 | 18.25302 | 21.33 | |
| | 30 min | 5 | 0.15 | 8.62472 | 6.89 | |
| | | 10 | 0.19 | 13.65818 | 5.34 | |
| | | 20 | 0.63 | 48.00707 | 1.58 | |
| | | 24 | 0.21 | 28.60377 | 4.74 | |
| | 1 hr | 5 | 0.40 | 31.26333 | 2.52 | |
| | | 10 | 0.06 | 52.95937 | 16.52 | |
| | | 12 | 0.05 | 90.17722 | 18.49 | |
| | N7101 | 15 min | 5 | 0.68 | 66.57894 | 1.47 |
| | | | 10 | 0.69 | 92.27161 | 1.46 |
| 20 | | | 0.07 | 293.12150 | 14.31 | |
| 25 | | | 0.07 | 780.54868 | 15.02 | |
| 30 | | | 0.07 | 808.15321 | 15.28 | |
| 48 | | | 0.06 | 1165.27863 | 17.33 | |
| 30 min | | 5 | 0.69 | 274.17020 | 1.46 | |
| | | 10 | 0.07 | 658.08144 | 14.05 | |
| | | 20 | 0.06 | 1236.75030 | 16.42 | |
| | | 24 | 0.06 | 1232.20311 | 17.00 | |
| 1 hr | | 5 | 0.32 | 534.38342 | 3.17 | |
| | | 10 | 0.06 | 907.19616 | 15.99 | |
| | | 12 | 0.28 | 894.90041 | 3.60 | |

† : Peak of power spectral density was not detected.

リズム、サーカディアンリズムおよびウルトラディアンリズムが含まれる。

PRLの分泌動態は、季節および個体により異なったが、基本的にはGHと同様に、2~4時間の短時間の周期で振幅を繰り返す（ウルトラディアンリズムと考えられる）と同時に10時間以上の周期で緩やかな上昇（サーカディアンリズムと考えられる）がみられた。しかし、分泌動態の異なるいずれの個体のリズム周期を決めるのにも、グラフによる確認が必要であることが分かった。解析に用いるデータとしては15分など短いサンプリング間隔の測定値を用い、解析時に次数を上げて短時間の周期と同時に長時間の周期の検出も検討するという手段が最適であると考えられた。しかし、GHと同様、30分間隔の測定値で解析した場合でも、短時間の周期が1時間前後の値であれば、±0.5時間程度の誤差は生じるが、

15分間隔の測定値で解析した場合とほぼ同様の結果が得られると考えられた。

また、次数の決定について、本実験における各サンプリング間隔でのサンプリング数Nおよび日野（2010）の公式を用いて求めた最適次数mの推定値はGHと同様の値である。

結 論

MEMによるGHおよびPRL分泌リズムの解析に適切な測定条件として以下を推奨する。まず、15分間隔など短いサンプリング間隔の測定値で解析し、次数を上げて短い周期と同時に長い周期の検出も検討する。この時、最適次数を見積もる方法として、日野（2010）の公式を用いると良い。ただし、30分間隔の測定値で解析をした場合でも、15分間隔の測定値で解析した場合とほぼ同様

の結果が得られる。また、10 時間を超える長い周期（或いはサーカディアンリズム）がある場合には、少なくとも 30 時間以上の連続した測定期間が必要である。

謝 辞

本実験の遂行に当たりご助言をいただいた北里大学獣医学部附属 FSC 農場職員の久保田昭二氏に感謝する。

文 献

Borromeo V, Cremonesi F, Perucchetti E, Berrini A, Secchi C. 1994. Circadian and circannual plasma secretory patterns of growth hormone and prolactin in Fresian heifers : hormonal profiles and signal analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Comparative Physiology* **107**, 313-321.

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. *Journal of Endocrinology* **111**, 209-215.

Cho SJ, Hard DL, Carpenter LS, Diekman MA, Anderson LL. 1998. Seasonal regulation of prolactin secretion in hypophyseal stalk transected beef calves. *Animal Reproduction Science* **52**, 253-265.

Dahl GE, Buchanan BA, Tucker HA. 2000. Photoperiodic effects on dairy cattle : a review. *Journal of Dairy Science* **83**, 885-893.

Drisko JE, Faidley TD, Chang CH, Zhang D, Nicolich S, Hora DF Jr, McNamara L, Rickes E, Abribat T, Smith RG, Hickey GJ. 1998. Hypophyseal-portal concentrations of growth hormone-releasing factor and somatostatin in conscious pigs : relationship to production of spontaneous growth hormone pulses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **217**, 188-196.

Ernst R. 1989. Fine-tuning flock management : lighting. *Egg Industry* **95**, 8-9.

Fabry J, Bulteau M, Thielemans MF, Oger R, Reuter AM, Franchimont P. 1984. *Annales d'endocrinologie (Paris) (Abstract)* **45**, 119-124.

Finkelstein JW, Roffwarg HP, Boyar RM, Kream J, Hellman L. 1972. Age-related change in the twenty-four-hour spontaneous secretion of growth hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **35**, 665-670.

Hanninen L, Lovendahl P, De Passille AM, Rushen J. 2006. The effect of floor type or relocation on calves' pulsatile growth hormone and cortisol secretion. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal Science* **56**, 99-108.

日野幹雄. 2010. スペクトル解析. 新装版. 朝倉書店, 東京.

Johke T. 1969. Radioimmunoassay for bovine prolactin in plasma. *Endocrinologia Japonica* **16**, 581-589.

Johke T. 1978. Effects of TRH on circulating growth hormone, prolactin and triiodothyronine levels in the bovine. *Endocrinologia Japonica* **25**, 19-26.

Johke T, Hodate K, Kawabata A. 1982. Effect of season on serum prolactin levels in heifers and goats. *Bulletin of National Institute of Animal Industry* **38**, 39-45.

Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research* **40**, 185-

232.

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. *Animal Science Journal*. (In press)

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. *Journal of Animal Science* **86**, 1799-1807.

Koprowski JA, Tucker HA, Convey EM. 1972. Prolactin and growth hormone circadian periodicity in lactating cows. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **140**, 1012-1014.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.

Lefcourt AM, Bitman J, Wood DL, Akers RM. 1995. Circadian and ultradian rhythms of peripheral growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* **12**, 247-256.

Marcek JM, Swanson LV. 1984. Effect of photoperiod on milk production and prolactin of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* **67**, 2380-2388.

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. *Endocrine Journal* **49**, 145-151.

Mollett TA, Malven PV. 1982. Chronological profiles of prolactin and growth hormone in lactating cows. *Journal of Dairy Science* **65**, 211-216.

Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F. 1979. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* **6**, 305-323.

大友詔雄, 田中幸雄. 1992. 血圧の日内変動の周期構造の解析方法. In : 三宅浩次, 高橋延昭, 神山昭男, 大友詔雄 (eds), 生体リズムの構造. pp. 81-102. 富士書院, 北海道.

Ozawa A, Hodate K, Miyamoto S, Ohtani F, Tsushima T, Johke T. 1991. Plasma profiles of insulin-like growth factor-1 for 24 hours and after injection of bovine growth hormone in dairy heifers. *Animal Science Technology (Japan)* **62**, 933-938.

Peters RR, Chapin LT, Leining KB, Tucker HA. 1978. Supplemental lighting stimulates growth and lactation in cattle. *Science* **199**, 911-912.

Plouzek CA, Trenkle A. 1991. Growth hormone parameters at four ages in intact and castrated male and female cattle. *Domestic Animal Endocrinology* **8**, 63-72.

Tannenbaum GS, Martin JB. 1976. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **98**, 562-570.

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature* **389**, 512-516.

寺池三郎. 1992. MEM スペクトルのラグ依存性. In : 三宅浩次, 高橋延昭, 神山昭男, 大友詔雄 (eds), 生体リズムの構造. 第1版. pp. 59-68. 富士書院, 北海道.

常盤野和男, 大友詔雄, 田中幸雄. 2008. 最大エントロピー法による時系列解析. 第2版. 北海道大学出版会, 北海道.

Tucker HA, Ringer RK. 1982. Controlled photoperiodic environments for food animals. *Science* **216**, 1381-1386.

- Ulrych TJ, Bishop TN. 1975. Maximum entropy spectral analysis and autoregressive decomposition. *Reviews of Geophysics and Space Physics* **13**, 183-200.
- Wheaton JE, Al-Raheem SN, Massri YG, Marcek JM. 1986. Twenty-four-hour growth hormone profiles in Angus steers. *Journal of Animal Science* **62**, 1267-1272.
- 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87**, 5160-5167.
- 米山公啓, 加茂 力, 林 列成, 田中幸雄. 1992. 汎用時系列データ解析システム MemCalc と血圧日内変動解析への応用. In : 三宅浩次, 高橋延昭, 神山昭男, 大友詔雄 (eds), 生体リズムの構造. 第1版. pp. 103-114. 富士書院, 北海道.
- 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.

Maximum entropy method for the spectral analysis of secretory rhythms of plasma growth hormone and prolactin in cattle

Mizuna OGINO¹, Akihiro MATSUURA¹, Atusi YAMAZAKI¹, Mami IRIMAJIRI¹, Shiro KUSHIBIKI², Hiroyuki SHINGU², Etsuko KASUYA³ and Koichi HODATE¹

¹ Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Towada, Aomori 034-8628, Japan

² National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba 305-0901, Japan

³ National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba 305-0901, Japan

Corresponding : Koichi HODATE (fax : +81 (0) 176-23-8703, e-mail : mkhodate@vmas.kitasato-u.ac.jp)

We investigated secretory rhythms of the plasma growth hormone (GH) and prolactin (PRL) in cattle by spectral analysis using the maximum entropy method (MEM). MEM is considered more useful than the fast Fourier transform (FFT) and Cosinor methods because MEM can yield results of high spectral resolution, with high precision and analytical capability from short-period data. However, few challenges are faced in performing spectral analysis by MEM with regard to sampling interval and lag. Cyclic rhythms (hours) of hormone secretion in cattle determined by MEM under different conditions of sampling interval and lag within different seasons were compared. For hormones such as GH and PRL that exhibit both short-period (ultradian) and long-period (circadian) secretory rhythms, MEM was found to be the best method for sampling by short-time interval, for example, 15 min and in addition, increasing the lag number made the detection of both short- and long- period rhythms possible. However, the analysis of 30-min interval sampling data yielded a result similar to that of 15-min interval data. Therefore, for the investigation of secretory pattern with longer than 15-h rhythm, consecutive sampling of longer than 30 h is needed.

Nihon Chikusan Gakkaiho 83 (1), 35-46, 2012

Key words : cattle, growth hormone, prolactin, secretion rhythm, spectral analysis.