家畜における性腺刺激ホルモンの Immunoassay に関する研究

II. 黄体形成ホルモン免疫血清の生物学的作用について

森 純一・藤崎尚徳・檜垣繁光・細田達雄

(農林省畜産試験場)

性腺刺激ホルモンを動物に長期間にわたって、連続投与すると、経過にともなってその生物学的作用が次第に漸減する。これはホルモンの投与により動物体内にホルモン作用を中和する物質が生産されるためであり¹⁾、Collip²⁾はこの中和物質を **antihormone** と命名した。その後、この **antihormone** は動物の体内において、投与されたホルモンに対して中和反応を示すばかりでなく、その血清を他の動物に投与した場合にも、同様に生物反応を阻止する作用のあることが明らかとなった^{3,4)}。この **antihormone** の本態に関しては、抗ホルモン説²⁾に引続いて、**antihormone** 作用と血清中の沈降素量が平行することから、**antihormone** 作用は血清抗体によるものであるとする免疫抗体説が Twombly⁵⁾によって提唱されている。またこれまでの胎盤性性腺刺激ホルモン(HCG)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、プロラクチン、成長ホルモン(GH)、インシュリンなどの免疫血清についての研究^{2,6-9)}において、これら免疫血清はいずれも抗原ホルモンの生物学的作用を抑制する性質を有することが報告されている。

著者ら¹⁰⁾はさきに牛下垂体より抽出した黄体形成ホルモン(NIH-LH-B₈)をウサギに注射して、作製した牛 LH 免疫ウサギ血清の血清学的性状を調べた結果、免疫血清中には、牛 LH に対する沈降素が産生され、この免疫血清を牛血清および牛甲状腺刺激ホルモン(TSH-B₈)によって吸収すると、牛 LH に対して特異的に反応する免疫血清が得られることを報告した。

本報告では、さらにこの牛 LH 免疫ウサギ血清の生物学的作用を明らかにする目的で、抗原である牛性腺刺激

ホルモンに対する生物学的抑制効果を調べるとともに、さらに羊および豚の性腺刺激ホルモン、PMSG および HCG の生物学的作用に対する効果についても検討を加えた。なお、これら外因性に与えたホルモンに対する効果のほか、内因性性腺刺激ホルモンに対する影響についても検討を加えた。

材料および方法

1) 供試免疫血清

免疫血清は前報¹⁰⁾において報告した牛 LH 免疫ウサギ血清を用いた。

2) 供試ホルモン

LH 標品としては、牛の NIH-LH-B₄ および羊の NIH-LH-S₈ をそれぞれ使用した。また家畜の下垂体性性腺刺激ホルモン* および PMSG**, HCG*** はいずれも市販品を用いた。

3) 供試動物

生物反応には Wistar-Imamichi 幼若ラットおよび New Zealand White 種の成熟雌ウサギを用いた。

4) 方法

LH 免疫血清の各種性腺刺激ホルモンの生物学的作用におよぼす影響を検討するためには、ラットおよびウサギの生物反応を用いた。

a) LH に対する作用: PARLOW¹¹⁾ の卵巣アスコルビン酸減少法(OAAD 法)によった。すなわち、LH 標

* 牛は Hypohorin(帝國臓器製薬社製), 羊は Vetrophin (Abbott 社製), 豚は Proserin (昭和薬品化工社製)

** PMSG は Anteron (Schering 社製)

*** HCG は Primogonyl (Schering 社製)

☆ 偽妊娠処置は、生後 25 日令の Wistar-Imamichi 系雌ラットに PMSG 75 IU を皮下注射し、さらに 56 時間後に HCG 30 IU の皮下注射を行なって、7~9 日後に使用した(本文次頁)。

Immunological studies of gonadotrophins in animal.
II. Some biological properties of antiserum to bovine luteinizing hormone.

MORI, Junichi, Takanori FUJISAKI, Shigemitsu HIGAKI & Tatsuo Hosoda (National Institute of Animal Industry, Chiba-shi) *Jap. J. Animal Reprod.* 13 (2), 1967.

品 15 μ g を 0.5 ml の生理的食塩水に溶解し、これに LH 免疫血清 0.5 ml を加えて混和のうえ、一夜冷蔵庫中に放置した。翌朝沈澱を除去し、その上清を偽妊娠処置☆をしたラットに投与して、その卵巣アスコルビン酸減少率を求めた。一方対照として、LH 免疫血清の代りに同量の正常ウサギ血清を加えて、その卵巣アスコルビン酸減少率を求め、両者の差から LH の生物学的作用におよぼす LH 免疫血清の影響を調べた。

b) 牛、羊および豚の下垂体性性腺刺激ホルモンに対する作用: FRIEDMAN¹²⁾ のウサギ排卵反応によった。すなわち、それぞれの性腺刺激ホルモン 4 Rab. U 相当量を 0.5 ml の生理的食塩水に溶解し、これに LH 免疫血清 0.4 ml を加えて、一夜冷蔵庫中に放置した。翌朝沈澱を除去して、その上清をウサギに静注した。翌日(注射後約 21 時間)開腹して、卵巣検査により排卵の有無を調べた。一方、対照として LH 免疫血清の代りに同量の正常ウサギ血清を加えたものについて同様の操作を行ない、両者の排卵率を比較した。

c) PMSG および HCG に対する作用: 日本薬局法の PMSG および HCG の検定法を準用した。すなわち、PMSG 20 IU を生理的食塩水 2.0 ml に溶解し、これに LH 免疫血清 0.5 ml を加えて一夜冷蔵庫中に放置した。翌日体重約 45 g の雌ラットに全量皮下注射し、6 日目に屠殺して卵巣を摘出し、Bouin 液に一夜浸漬、アルコールで脱水の後、卵巣重量を測定した。一方、対照として、LH 免疫血清の代りに同量の正常ウサギ血清を加えたものについて、同様の操作を行ない、両者の卵巣重量を比較した。

また、HGG については 16 IU を生理的食塩水 2.0 ml に溶解し、これに LH 免疫血清 0.5 ml を加えて一夜冷蔵庫中に放置した後、翌日から体重約 45 g の雌ラットに 1 日 1 回 0.5 ml ずつ 5 日間皮下注射した。6 日目に卵巣を摘出して、PMSG の場合と同様の処理を行ない、卵巣重量を測定した。また、対照については、PMSG と同様に正常ウサギ血清を加えて処置を行ない、卵巣重量の測定により両者の比較を行なった。

d) ウサギおよびラットの内因性性腺刺激ホルモンに対する作用: (i) ウサギ 耳静脈より LH 免疫血清 0.5 ml を静注した後、雄と交配せしめ、翌日(交尾後約 21 時間)開腹して、卵巣検査により排卵の有無を調べた。一方、対照としては、LH 免疫血清の代りに、同量の正常ウサギ血清を静注し、同様に雄と交配せしめて、両者の排卵率の比較を行なった。(ii) ラット 生後 22 日令の雄ラットに、5 日間 1 日 1 回 LH 免疫血

清 0.5 ml ずつを腹腔内に注射し、6 日目に屠殺して、辜丸および前立腺腹葉を分離摘出した。辜丸はただちに秤量し、前立腺腹葉は Bouin 液に 24 時間浸漬、固定の後秤量した。一方、対照には LH 免疫血清の代りに同量の正常ウサギ血清を注射したものをを用い、両者の辜丸重量および前立腺腹葉重量の値を比較した。

成 績

1) 牛および羊 LH の生物学的作用におよぼす影響 LH を投与することにより、ラットの卵巣アスコルビン酸含量は減少し、その減少率は LH の量の増加とともに大となることが知られている¹¹⁾。この反応を利用して、牛の LH 作用に対する LH 免疫血清の影響を調べた結果は、Fig. 1—(1) に示す如く、対照の LH (15 μ g) — 正常ウサギ血清投与群では卵巣アスコルビン酸減少率が 45.0% であったのに対し、LH (15 μ g) — LH 免疫血清投与群では 12.1% であり、LH 免疫血清添加群において明らかに牛 LH の生物反応の抑制が認められた。

また、羊の LH 作用に対する影響を同様に調べた結果は、Fig. 1—(2) に示す如く、卵巣アスコルビン酸減少率は対照群の 58.6% にに対し、LH 免疫血清添加群では 24.0% であり、牛 LH 免疫ウサギ血清の添加によって、牛 LH の場合と同様に、羊 LH においても、その生物学的作用の抑制が認められた。

2) 牛、羊および豚の下垂体性性腺刺激ホルモンの生物学的作用におよぼす影響

ウサギの排卵反応を指標として、牛、羊および豚の性腺刺激ホルモン (GTH) に対する牛 LH 免疫ウサギ血清の影響を調べた結果は Table 1 に示す如くである。すなわち、牛については、対照の GTH—正常ウサギ血清投与群の全例が排卵しているのに対し、GTH—LH 免疫

Fig. 1. Inactivation of bovine and ovine luteinizing hormone with the antiserum to bovine luteinizing hormone.

Table 1. Inactivation of bovine, ovine and porcine gonadotrophins with the antiserum to bovine luteinizing hormone

GTH	Rabbit ovulation rate	
	GTH+NRS*	GTH+Antiserum
Bovine	100% (5/5)**	0% (0/5)
Ovine	100 (4/4)	0 (0/4)
Porcine	100 (3/3)	0 (0/3)

* Normal rabbit serum

** Nos. of positively responded animals/Nos. of injected animals

血清投与群では 5 例全部の排卵が抑制され、羊についても対照群の全例が排卵しているのに対し、免疫血清添加群では全例の排卵が抑制された。また、豚についても、それぞれ 3 例の実験を行なったが、対照群の全例排卵に対し、免疫血清添加群ではすべて排卵が抑制された。

これらの結果から牛 LH 免疫ウサギ血清は抗原である牛性腺刺激ホルモンを不活化するのみでなく、羊および豚の性腺刺激ホルモンにも作用し、これを不活化することが判明した。

3) PMSG および HCG の生物学的作用におよぼす影響

PMSG に対する影響を調べた結果は Fig. 2—(1) に示す如く、対照群の卵巣重量が 32.6 mg であるのに対し、LH 免疫血清添加群の卵巣重量は 5.9 mg であって、免疫血清添加群の卵巣重量が対照群に比し明らかに小さく、免疫血清の添加により、PMSG の生物学的作用の抑制が認められた。一方、HCG についての結果は Fig. 2—(2) に示す如く、対照群の卵巣重量が 13.9 mg であるのに対し、LH 免疫血清添加群における卵巣重量は

Fig. 2. Inactivation of PMSG and HCG with the antiserum to bovine luteinizing hormone.**Table 2.** Inactivation of rabbit endogenous gonadotrophin with the antiserum to bovine luteinizing hormone

	Rabbit ovulation rate
NRS*	100% (4/4)**
Antiserum	0 (0/4)

* Normal rabbit serum

** Nos. of positively responded animals/Nos. of injected animals

14.0 mg で、両者の間に有意な差は認められなかった。従って、LH 免疫血清は PMSG に対しては生物学的作用を抑制したが、HCG に対しては抑制作用が認められなかった。

4) ウサギおよびラットの内因性性腺刺激ホルモンにおよぼす影響

ウサギは交尾排卵の動物であり、交尾刺激によって下垂体から性腺刺激ホルモンが分泌され、排卵がおこることが知られている。従って、交尾前に LH 免疫血清を投与した場合の排卵率と、免疫血清の代りに対照として正常血清を投与した場合の排卵率を比較して、ウサギの内因性性腺刺激ホルモンに対する LH 免疫血清の影響を調べた。その結果は Table 2 に示す如く、対照群の排卵率 100% に対し、LH 免疫血清投与群では全例ともに排卵が抑制された。このことから、ウサギの内因性性腺刺激ホルモンは家畜の性腺刺激ホルモンの場合と同様に、LH 免疫血清によって不活化されることが認められた。

同様にラットにおける内因性性腺刺激ホルモンに対する影響を知る目的で、前立腺腹葉および睪丸重量の変化について調べた。すなわち、LH 注射により雄性動物では前立腺腹葉および睪丸重量が増加することが知られて

Fig. 3. Inactivation of rat endogenous gonadotrophin with the antiserum to bovine luteinizing hormone.

いるので、幼若雄ラットに LH 免疫血清を投与して、前立腺腹葉および睪丸重量の変化を調べた。結果は Fig. 3 に示す如く、前立腺腹葉、睪丸重量ともに免疫血清投与群が対照の正常ウサギ血清投与群に比較して減少し、牛 LH 免疫血清によりラットの内因性性腺刺激ホルモンは明らかに抑制されることが認められた。

考 察

従来家畜の性腺刺激ホルモンは各家畜ごとにその物理学的ならびに化学的性状が異なると考えられているにもかかわらず、特定の家畜の性腺刺激ホルモンが他の家畜の性腺に対しても刺激効果をおよぼすことが知られている。この理由については、各家畜におけるホルモンの分子自体には相違が認められても、生物学的作用を發揮する部分はどの家畜のホルモンも同じか、または良く似たものであるためではないかと推察されている¹³⁾。

著者らは、LH 免疫血清の各家畜の性腺刺激ホルモンの生物学的作用におよぼす影響について検討した結果、牛 LH 免疫ウサギ血清は、抗原である牛性腺刺激ホルモンのほか、羊および豚の性腺刺激ホルモンの生物学的作用をも抑制することを認めた。またこの免疫血清は、これら生物学的作用以外に、血清反応においても牛性腺刺激ホルモンのほか、羊および豚の性腺刺激ホルモンと沈降反応をおこすことを認めた¹⁴⁾。このようなホルモンの生物学的作用の抑制および血清反応の強弱に家畜の種属差が存在するか否かについての検討はまだ行っていないが、これまでに得られた結果からは、上記家畜の下垂体性性腺刺激ホルモンは、生物学的作用を發揮する部分が類似しているばかりでなく、免疫学的な抗原部分においても同一かまたは近似したものであることが推察される。

一方、PMSG および HCG については、前者は免疫血清によりその生物学的作用が抑制されたが、後者は抑制されなかった。また、血清反応における沈降反応では、PMSG も HCG もともに反応が認められなかった¹⁴⁾。これら免疫血清によるホルモンの生物学的作用の抑制および血清反応には、免疫血清の量および質の違いおよび抗原ホルモン量の多少等も関与すると考えられるので断定は出来ないが、著者らの行った範囲の実験結果からは、PMSG および HCG の如き胎盤由来の性腺刺激ホルモンは、前述の下垂体由来の性腺刺激ホルモンとは若干その免疫学的な性状を異にしているものと推察される。またその性状の相違は HCG において特に著しいものと思われる。

著者らは、今日まで牛 LH 免疫ウサギ血清と性腺刺激ホルモンの生物学的作用との間の関係について検討を行なった報告に接していないが、抗原の異なる羊 LH 免疫ウサギ血清については HENRY ら¹⁵⁾、MOUDGAL ら¹⁶⁾、FLUX ら¹⁸⁾、がまた馬 LH 免疫ウサギ血清については DESJARDINS ら¹⁷⁾ が研究を行ない、これらの関係を報告している。すなわち、HENRY ら¹⁵⁾ は羊 LH 免疫ウサギ血清は抗原である羊 LH のほか、牛の性腺刺激ホルモンの生物学的作用を抑制したが、豚の性腺刺激ホルモンおよび HCG については抑制が認められなかったと報じ、MOUDGAL ら¹⁶⁾ は羊、牛および豚の性腺刺激ホルモンおよび PMSG はともに抑制したが、HCG に対しては抑制作用がなかったとしている。また FLUX ら¹⁸⁾ は PMSG および HCG の生物学的作用はともに抑制されるが、HCG の場合には免疫血清が少量の場合は抑制が認められず、大量の場合にのみ抑制効果のあらわれることを報じている。一方、DESJARDINS ら¹⁷⁾ は、馬 LH 免疫ウサギ血清は馬、牛、羊およびラットの性腺刺激ホルモンの生物学的作用を抑制すると報告している。

これらの成績をみると、HENRY ら¹⁵⁾ が羊 LH 免疫ウサギ血清は豚の性腺刺激ホルモンの生物学的作用を抑制しなかったと云う報告のほかは、羊および馬の LH 免疫血清はいずれも、家畜の下垂体性性腺刺激ホルモンを抑制している。そして、HCG については、FLUX ら¹⁸⁾ のほかはすべて抑制しなかったことを報告している。また、PMSG については、MOUDGAL ら¹⁶⁾、FLUX ら¹⁸⁾ がともに抑制したことを報告している。

著者らの実験においては、免疫血清の作製に用いた抗原は牛 LH で、これらの報告の抗原とは異なっているが、その生物学の性状はこれまでの羊および馬の LH 免疫血清の場合とほぼ同様であった。

ただ、FLUX ら¹⁸⁾ が HCG に対して抑制効果があったと報告した羊 LH 免疫ウサギ血清は、血清反応においても HCG との間に交叉反応を認めているが、その他の報告では著者らのものも含めてすべて血清学的な交叉反応を認めていない。従って、HCG に対する反応の結果が異なるのは、このような免疫血清の性状の違いによるものとも考えられる。これらの点についてはさらに過免疫を行なった免疫血清により検討する必要があるものと思われる。

摘 要

牛 LH 免疫ウサギ血清の各種性腺刺激ホルモンの生物学的作用に対する影響をラットおよびウサギを用いて検

討した結果、次のことが判明した。

1) 牛 LH 免疫血清は、LH に特異的な生物反応と考えられるラット 卵巣アスコルビン酸減少法において、抗原である牛 LH の生物学的作用を抑制した。

2) 牛 LH 免疫血清は抗原である牛 LH 以外に、羊 LH のラット 卵巣アスコルビン酸減少能を抑制した。

3) ウサギの排卵反応を指標とした場合、牛 LH 免疫血清は、抗原である牛性腺刺激ホルモンのほか羊および豚性腺刺激ホルモンの生物学的作用を抑制した。

4) 牛 LH 免疫血清は PMSG のラット 卵巣重量増加作用を抑制したが、HCG のそれは抑制しなかった。

(1967. 4. 22 受付)

文 献

1) ZONDEK, B.: Die Hormone des Ovariums und des Hypophysen-vorderlappen. Berlin, 1931. (日本臨床 **23**, 974, 1965 より引用) 2) COLLIP, J.B.: *Am. J. Physiol.* **109**, 22, 1934. 3) PARKES, A.S. & I.W.

ROWLAND: *J. Physiol.* **88**, 305, 1936. 4) ANDERSON, E.M.: *Endocrinol.* **41**, 105, 1941. 5) TWOMBLY G. H.: *ibid* **20**, 311, 1936. 6) PASCASIO, F.M. & H. SELENKOW: *ibid* **71**, 254, 1962. 7) HAYASHIDA, T.: Ciba Found. Colloq. on Endocrinol. **14**, 338, 1962. 8) GRUMBACH, M.M. & S.L. KAPLAN: *ibid* **14**, 63, 1962. 9) ARQUILLA E.R.: *ibid* **14**, 146, 1962. 10) 森(純)・檜垣(繁)・細田(達): 家畜繁殖誌, **12**, 140, 1967. 11) PARLOW A.F.: *Fed. Proc.* **17**, 402, 1958. 12) FRIEDMAN M.H.: *Am. J. Physiol.* **90**, 617, 1929. 13) FLUX D.S. & C.H. LI: *Acta Endocrinol.* **48**, 61, 1965. 14) 森(純)・檜垣(繁)・細田(達): 未発表. 15) HENRY, S.S. & H.B. VAN DYKE: *J. Endocrinol.* **16**, 310, 1958. 16) MOUDGAL N.R. & C.H. LI: *Arch. Biochem & Biophys.* **95**, 93, 1961. 17) DESJARDINS C. & H.D. HAFS: *J. Animal Sci.* **24**, 347, 1965.

Summary

Some serological characteristics of an anti bovine luteinizing hormone (NIH-LH-B₃) rabbit serum were reported in the previous paper and it was concluded that the serologically specific antiserum to LH was obtained after absorption with bovine serum and bovine thyroid stimulating hormone.

In the present paper some biological properties of an anti bovine LH serum were reported.

The antiserum was obtained by immunizing rabbits with bovine LH by the modified method of Moudgal and Li¹⁶⁾.

The effect of the antiserum on the biological activities of bovine and ovine LH were studied by the method of rat ovarian ascorbic acid depletion described by Parlow¹¹⁾. A group of rats was injected LH and the antiserum while the other, control group, was injected LH and normal rabbit serum. Ovarian ascorbic acid depletion of the rats injected LH and the antiserum was less than that of control. Therefore, it became obvious that biological activities of bovine and ovine LH were inactivated by the antiserum to bovine LH.

The effects of the antiserum on the biological activities of bovine, ovine and porcine gonadotrophins (GTH) were determined by the rabbit ovulation test. Ovulation occurred in the control rabbits injected intravenously mixture of rabbit serum and GTH of the each species, but did not appear in the rabbits injected mixture of the antiserum and GTH of the each species. The results show that the biological activities of bovine, ovine and porcine GTH were inhibited by the antiserum.

The effects of the antiserum on the biological activities of PMSG and HCG were determined by the rat ovarian weight method. The ovarian weight of rats injected PMSG and the antiserum was less than that of control group. This shows that the biological activities of PMSG was inhibited by the antiserum. As to HCG, however, the ovarian weight of rats injected HCG and the antiserum was not reduced than that of control group. This shows that the biological activities of HCG was not inhibited by the antiserum.

The effects of the antiserum on the biological activities of endogenous GTH in rabbit and rat were examined. Some adult female rabbits were injected the antiserum intravenously and immediately after injection they were mated with male rabbits. Control rabbits were injected a normal rabbit serum instead of the antiserum. None of the rabbits injected the antiserum had ovulation but all of the control rabbits had ovulation. Some intact male rats, 22 days old, were injected the antiserum intravenously for 5 days. On the 27th day of birth, they were autopsied and the weights of testis and ventral prostate were measured. The weights of testis and ventral prostate of rats treated with the antiserum were less than that of control rats which received the injection of normal rabbit serum. These results show that the antiserum inhibited the biological activities of endogenous GTH in the rabbit and the rat.

Acknowledgment

The authors wish to express their gratitude to the Endocrinology Study Section, National Institutes of Health, U.S.A., for the gifts of the purified pituitary hormones.