妊馬血清性腺刺激ホルモンに対する

dd-マウスの生殖腺反応について

窪道 護夫・*猪 貴義・鈴木 勝夫

(農林省動物医薬品検査所・*農林省家畜衛生試験場)

CLARINGBOLD ら¹⁾, DONNELLY ら²⁾は妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG), 妊婦胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG) 製剤に対するマウス子宮重量反応の用量反応曲線の傾斜は, 各製剤, 各系統マウス間で差異はみられないと報告したが, BROWN³⁾ はマウス子宮重量反応曲線の傾斜は, PMSG, HCG 製剤, 各系統マウス間で異なると報告している。また, 長沢ら⁴⁾ は ddN-マウスの卵巢重量法は PMSG の検定に可能であるが, 多量の検体を必要とし, 用量反応曲線の傾斜は大きくないとし, 佐藤ら⁵⁾ の ddN-マウスの PMSG に対する卵巢・子宮重量反応とは異なると報告している。

以上のように, PMSG に対するマウスの生殖腺反応は各研究者によって異なった結果が得られ, 一致した結論は得られていない。従って, マウスによる PMSG の生物学的測定を行なうに当たって, その基礎的検討が必要であるとみられる。

そこで, 著者らは約 21 日令の dd-幼若雌マウスを用いて PMSG に対する生殖腺反応の経時変化と PMSG の作用時間からみた至適解剖時間について検討した。

実験材料と方法

材料: PMSG は国際単位 (I.U.) 表示の標準品でこれを滅菌生理食塩液で溶解稀釈し, 0.2 ml に 10 I.U. を含有するホルモン溶液を調製した。

動物: dd-幼若雌マウスの約 21 日令の健康マウスで体重 8.0~9.0 g 前後を用いた。

方法: 生理食塩液ならびに PMSG 10 I.U. 液を各試験群のマウス 1 頭につき 0.2 ml を 1 回腹部皮下に注射し

On the response of reproductive organs in dd mice by the Pregnant Mare Serum Gonadotropin.

KUBOMICHI, Morio, *Takayoshi Ino & Katsuo SUZUKI (National Veterinary Assay Laboratory, Kokubunji, Tokyo 185 & *National Institute of Animal Health, Tokyo)

Jap. J. Animal Reprod. 15 (1), 1969.

た。注射後, 腔開口反応, 出血卵胞黄体形成反応, 卵巢・子宮重量について観察した。腔開口反応は腔の開口をもって陽性とし, 出血卵胞黄体形成反応は卵巢に出血卵胞黄体の出現をもって反応陽性とした。卵巢・子宮の重量測定においては周囲の附着組織を除去し, 子宮では子宮角を切断し貯溜水を濾紙で吸着除去した後に測定した。

なお, PMSG 10 I.U. は dd-幼若雌マウスの生殖腺反応を惹起するに適するホルモン用量であることを予備試験で確認したので, このホルモン量を用いた。また, PMSG の注射回数について, BRENNEMAN⁶⁾ は雄鶏の睪丸重量増加作用は 1 回注射に比較して反復注射の効果は大きいとし, COLE ら⁷⁾, MEYER ら⁸⁾ は未成熟ラットの卵巢重量増加作用は 1 回注射は反復注射より効果が大きいと報告しているが, 著者らは PMSG は HCG の反復皮下注射による効果とは異なり 1 回皮下注射でマウスに明確な生殖腺反応を惹起することが可能であることと, 注射の反復による生体を与える影響ならびに実験誤差をできるだけ除去するために 1 回皮下注射法を用いた。

実験結果と考察

1) PMSG に対する生殖腺反応の経時変化

Table 1 は生理食塩液および PMSG 10 I.U. 注射後 24 時間間隔で, 0 から 192 時間までの腔開口反応, 出血卵胞黄体形成反応, 卵巢・子宮重量反応とその変動係数の推移を示す。生理食塩群においては腔開口反応は注射後, 時間の経過とともに不規則な反応陽性率を示したが, 出血卵胞黄体形成反応は 192 時間まで発現せず, 卵巢重量は 2.71~3.71 mg で大きい変動を示さないことがみられる。子宮重量は体重の増加に伴い高まる傾向にあるが, 192 時間までの平均値は 9~10 mg であった。一方, PMSG 群においては腔開口反応は 72 時間で 93.5 %を示し, それ以後は 100 %の陽性率であった。出血卵胞黄体形成反応は 48 時間, 72 時間と反応陽性率は高ま

Tabel 1. Changes in weight of body and reproductive organs in dd mice injected with physiological saline and 10 I.U. of PMSG

Group of physiological saline									
Time Hours	No. of mice	Body Weight (g)	Vaginal Opening (%)		Hemorrhagic follicle and corpora lutea (%)		Ovarian Weight (mg)	Uterine Weight (mg)	CV (%)
0	15	8.34±1.1*	1/15	6.7	0/15	0	2.83±0.56**	6.32±0.73**	20.6
24	15	8.55±1.2	2/15	13.3	0/15	0	2.76±0.62	5.28±0.67	22.8
48	15	9.27±1.1	2/15	13.3	0/15	0	3.46±0.78	6.20±0.78	22.6
72	14	10.13±1.1	4/14	28.6	0/14	0	3.54±0.86	7.26±1.09	26.2
96	15	10.63±1.2	9/15	60.0	0/15	0	3.71±0.95	8.24±1.29	27.9
120	15	11.40±1.2	2/15	13.3	0/15	0	3.53±0.78	7.65±0.84	19.6
144	15	12.00±1.2	8/15	53.4	0/15	0	2.71±0.56	9.27±1.74	33.5
168	13	12.42±1.6	5/13	38.5	0/13	0	2.91±0.60	10.32±1.92	31.0
192	14	12.81±1.7	13/14	86.8	0/14	0	2.94±0.57	9.12±2.36	45.0
Group of PMSG (10 I.U.)									
24	14	9.36±1.1	2/14	14.3	0/14	0	4.38±1.26	9.85±1.21	21.3
48	15	10.65±1.2	10/15	66.7	2/15	13.3	7.19±2.47	18.93±2.75	25.9
72	15	11.19±1.1	14/15	93.5	11/15	73.5	8.88±2.19	30.35±4.26	25.1
96	15	10.44±1.5	15/15	100.0	14/15	93.5	8.73±1.57	35.58±2.91	14.6
120	15	12.07±1.4	15/15	100.0	11/15	73.5	8.61±2.07	24.94±3.53	25.3
144	15	12.45±1.0	15/15	100.0	12/15	80.0	4.09±0.84	17.23±2.63	27.4
168	15	12.48±2.0	15/15	100.0	11/15	73.5	4.17±1.12	17.41±1.74	17.8
192	15	12.53±2.6	15/15	100.0	4/15	26.6	4.20±0.90	12.74±1.07	14.9

Remarks: * Standard deviation, ** 95% confidence limit

Fig. 1. Changes in weight of ovary and uterus in dd mice injected with physiological saline and 10 I.U. of PMSG.

り 96 時間で 93.5% と反応の peak を示したが 192 時間においては 26.6% の陽性率であった。また、卵巣・子宮重量は 72 時間、96 時間で反応値は漸増したが、以後、時間の経過とともに激減した (Fig. 1)。卵巣・子宮重量

について 72 時間、96 時間、120 時間の反応値を比較すると卵巣重量の平均値および 95% 信頼限界は大きい差異を示さないが、子宮重量では 72 時間、120 時間値に比較して 96 時間値は大きく、また、変動係数の低いことがみられる。

以上、記述したように PMSG に対する dd-マウスの生殖腺反応の経時変化は生理食塩群に対比して著明であることが認められる。

そこで、各生殖腺反応の相互の関係を検討すると PMSG 注射後、24 時間において卵巣・子宮重量は増加したが出血黄体形成反応は認められなかった。このことは PMSG に対する卵巣ホルモンの生産、分泌は 24 時間前から増加するとみられるのに対し出血黄体形成反応は 24 時間以降から発現すると認められる。また、膈開口反応、卵巣重量反応は 72 時間ではほぼ plateau の反応を示したが、子宮重量反応は 96 時間で plateau になった。卵巣重量反応と子宮重量反応の“ずれ”は PMSG の卵巣に対する直接作用による 1 次反応と PMSG が卵巣に作用した結果、刺激される卵巣ホルモンの生産、分泌に基づく 2 次反応ならびに卵巣ホルモンに対する子宮の反応性による差異であろうと考える。著者ら⁹⁾は AA, DD-マウスにおける性腺刺激ホルモンの path-way に関

Table 2. Comparison of reaction of reproductive organs in 72 hours and 96 hours in dd mice injected with 10 I.U. of PMSG

Time Hours	Drug	No. of mice	Body Weight (g)	Vaginal Opening (%)		Hemorrhagic follicle & C.L. (%)		Ovarian Weight (mg)	Uterine Weight (mg)	CV (%)
72	NaCl	12	10.61±1.0*	0/12	0	0/12	0	3.79±0.82**	6.81±1.57**	36.7
	PMSG	30	10.41±1.2	26/30	86.6	19/30	63.4	7.54±1.49	28.96±3.85	35.6
96	NaCl	12	11.28±1.2	3/12	25.0	0/12	0	2.97±0.76	8.08±1.13	22.3
	PMSG	30	11.27±1.3	30/30	100.0	26/30	86.6	7.90±1.05	35.19±2.80	21.3

Remarks: NaCl Physiological saline PMSG 10 I.U.

Hemorrhagic follicle and C.L. Hemorrhagic follicle and corpora lutea

* Standard deviation ** 95% confidence limit

する試験において、PMSG 過剰投与による卵巣別出マウス群の子宮重量反応、膣開口反応は陰性を示したが、子宮別出マウス群は卵巣反応、膣開口反応は陽性を示す結果を得た。このことは上記のことを立証するものと考えられる。

なお、120 時間以降における卵巣・子宮重量の減少は著しく、PMSG による卵巣ホルモンの生産、分泌は 120 時間以前に激減するとみられる。一方、出血卵胞黄体形成反応は 96 時間で plateau の反応陽性率を示したが 192 時間においては反応陽性率は漸減した。このことは卵胞内出血の吸収、黄体の退行変性等の修復機構の活動による結果とみられる。

次いで、PMSG の生物学的作用期間に関して、GREEN¹⁰⁾ は成熟マウスによる実験で、少なくとも 48 時間であるとしているが、LADMAN¹¹⁾ は未成熟マウスによる排卵反応で、ほぼ 6 日と報告している。著者らと GREEN、LADMAN らと取り扱った現象は異なるが、PMSG に対する各生殖腺反応の経時観察から、PMSG の生物学的作用期間は dd-幼若雌マウスではほぼ 120 時間であろうと考える。

2) PMSG の作用時間からみた至適解剖時間について

1) の結果から、PMSG に対して生殖腺反応の高まる 72 時間、96 時間の反応値について、試験を繰返し、その均一性、有意性について検討した。Table 2 はその結果を示す。PMSG 10 I.U. 注射の 72 時間群と 96 時間群の反応値を比較すると出血卵胞黄体形成反応、子宮重量反応ともに 96 時間群の大きいことが認められる。また、子宮の変動系数は 72 時間群に比較して 96 時間群は低く反応値の均一性を示すものとみられる。72 時間群、96 時間群における出血卵胞黄体形成反応、子宮重量反応

値について χ^2 , t -検定で有意性を検討したところ、 χ^2 計算値は 4.35, P は 0.05~0.02 であり、 t 計算値は 2.27, P は 0.05~0.02 で両反応値ともに 96 時間値は 72 時間値に比較して有意に増加すると認められる。

PMSG に対するマウスの生殖腺反応と解剖時間に関して、DONNELLY ら²⁾ は注射後 32~44 時間に解剖しているが、長沢ら³⁾ は注射後 6 日目に解剖している。SANTAMARINA¹²⁾ は PMSG 0.5 I.U. 注射後、12 時間経過すれば試験マウスの 95.5% は卵巣に生腺刺激反応を惹起すると報告しているが、著者らの試験から 12~44 時間では重量としては反応性の高まらない早期の反応値であり、120 時間以後は反応性の激減した末期の反応値を取り扱っているとみられる。一方、ROWLAND ら¹³⁾ は脳下垂体別出ラットの卵巣に排卵反応を惹起する PMSG の至適作用時間は 96 時間であるとしている。

著者らは PMSG に対する dd-幼若雌マウスの生殖腺反応が注射後 96 時間で高まり、均一性を示すことから、PMSG の dd-マウスによる生物学的測定においては 1 回皮下注射後、96 時間に解剖を行なうことが適切であると考えられる。

要 約

PMSG のマウスによる生物学的測定法を検討する目的で、約 21 日令の dd-幼若雌マウスを用い、PMSG 10 I.U. 1 回皮下注射の場合について生殖腺反応の経時変化と至適解剖時間について検討した。得られた結果は次のとおりである。

1) PMSG 10 I.U. 1 回皮下注射による dd-マウスの生殖腺反応は 72~96 時間で高まり、以後、時間の経過とともに激減した。とくに 120 時間後の卵巣、子宮重量の減少は著しく、PMSG の生物学的作用期間は dd-マ

ウスではほぼ 120 時間とみられる。

2) PMSG に対する 出血卵胞黄体形成反応, 子宮重量反応において高い反応値を示した 72 時間, 96 時間の反応値について比較検討した結果, 96 時間は 72 時間値に対して反応値は有意に高く, 均一性であることが認められた。

本研究の機会を与えられた東京農大川島秀雄教授, 農林省家畜衛生試験場藤田潤吉場長に感謝いたします。また, ご指導, ご批判を賜った農林省家畜衛生試験場須藤恒二博士に深謝いたします。(44 年 2 月 22 日受付)

文 献

- 1) CLARINGBOLD, P.J. & D.R. LAMOND: *J. Endocrinol.*, **16**, 86, 1957.
- 2) DONNELLY, R.B. & G.M. STONE: *J. Endocrinol.*, **21**, 459, 1961.
- 3) BROWN, P.S., E.J. CUNNINGHAM & R.P. FINEGAN:

J. Endocrinol., **18**, 191, 1959.

- 4) 長沢 (佳)・越村 (栄): 衛生試験所報告, **76**, 225, 1958.
- 5) 佐藤 (武)・末広 (雅)・本所 (正): 厚生科学研究所報告, **3**, 53, 1954.
- 6) BRENNEMAN, W.B.: *Proc. Indiana Acad. Sci.* **54**, 207, 1945.
- 7) COLE, H.H., GUILBERT, H.R. & GROSS, H.H.: *Am. J. physiol.*, **102**, 227, 1932.
- 8) MEYER, R.K. & MCSHAN, W.H.: *Endocrinol.*, **29**, 31, 1941.
- 9) 窪道 (護)・猪 (貴)・鈴木 (勝): 未発表.
- 10) GREEN, J.A.: *Anat. Rec.*, **139**, 233, 1961.
- 11) LADMAN, A.J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **117**, 498, 1964.
- 12) SANTAMARINA, E.E. & L.L. JOVEN: *Acta Endocrinol.*, **36**, 65, 1961.
- 13) ROWLAND, I.W. & P.C. WILLIAMS: *J. Endocrinol.*, **3**, 310, 1943.

Summary

Investigation was made on a method of bioassay for the PMSG by using immature female dd mice of 21 days.

The response of reproductive organs injected with 10.0 International Unit of PMSG gave significant differences in each time at autopsy.

Responses of uterine weight, hemorrhagic follicles and corpora lutea forming reactions after once injection subcutaneously with 10.0 International Unit of PMSG were increased at 72 and 96 hours, ovarian and uterine weight responses were great decreased at 120 hours after injection, and it was confirmed that biological life of PMSG in dd mice was about 120 hours.

It was recognized that the responses between uterine weight, hemorrhagic follicles and corpora lutea forming reactions had higher significances and uniformity in 96 hours than in 72 hours at autopsy.