一 研 究 一

豚下垂体抽出物の卵巢機能減退牛への応用

武石 昌敬・永井 享・原田 豊造

西 芳秀・常包 正・*中野渡亀夫

(日本大学農獣医学部・*帝国臓器製薬株式会社)

牛の卵巢疾患の治療に用いられる性腺刺激ホルモンは、従来から多用されている HCG 並びに PMSG 製剤の外に各種家畜の下垂体製剤の応用が近年次第に増加している¹⁻⁸⁾。

これら下垂体製剤の応用増加の要因として、Anti-HCG 産生等⁹⁻¹²⁾ が考えられるが、今後これら製剤と HCG, PMSG 製剤の併用が卵巢疾患の治療上重要点であると考えられている。

著者らは雌豚の下垂体前葉から性腺刺激ホルモンを抽出し、これら抽出物(以下 A. P. G. と略称)の生物学的検定を行ない、さらにこれら A. P. G. を卵巢機能減退牛に対し静脈注射並びに1部皮下注射により投与し、これらの投与により本疾患への A. P. G. の有効量を知る目的で本研究を行なった。

実験材料並びに方法

1) 豚下垂体の採取並びに A. P. G. の抽出方法

材料は東京都立芝浦と畜場において、1963 年から 64 年に亘る 1 カ年間にと殺解体した直後の主として中型ヨークシャ系雌豚から下垂体約 4,000 個を採取し、冷アセトン液に浸漬したのち乾燥粉末として松島らの方法に準じて A. P. G. を抽出した。

抽出方法

アセトン乾燥粉末 (70 g)

20 倍の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 飽和水溶液を加え、pH 10.3 として冷却、3 時間後攪拌し、冷却超遠心分離 (10,000 r.p.m.) 10 分間

Sample ————— 上清
攪拌しながら 4 N HCl で pH 5 (沈澱抽出)
1 時間、冷却放置、冷却超遠心分離 (5,000 r.p.m.) 10 分間

Sample ————— PPT
冷却攪拌しつつ ethyl alcohol を滴下し 80% とし、1 昼夜放置、冷却超遠心分離 (5,000 r.p.m.)

PPT
ethyl alcohol 3 回、ether で 2 回洗滌、減圧乾燥

3.8 g

2) 生物学的検定方法

(i) 下垂体抽出幼若雄ラットでの生殖腺重量反応
GREEP の変法である今道ら¹³⁾ の ICSH 検定法に準じておこなった。

ラットは 23 日令の体重 28~40 g の幼若な Wistar 系雄ラット 32 匹を 5 群に分け、1 群 5~7 匹とした。

下垂体抽出 2 日後から A. P. G. を 1 日 1 回 4 日間にわたり 250, 500, 1,000 および 2,000 μg をそれぞれ皮下注射した。

最終注射から 24 時間目に剖検し、精巢、前立腺全重量並びに精囊重量をそれぞれトーションバランスで秤量した。

判定も今道ら¹³⁾の方法に準拠して、対照より前立腺重量を 100% 増加させた A. P. G. 量を 1 Prostate Unit (以下 Pr. U. と略称) とした。

(ii) ラット排卵反応

今道ら¹⁴⁾の方法に準じ、使用動物は正常に 4 日周期を画く成熟 Wistar 系雌ラットを用い、体重 100 g 以上のもの 20 匹を 5 匹ずつ 4 群に分けた。

A. P. G. は発情休止期後半を示す日の午後 4~7 時の間に、10, 25, 50 および 100 μg をそれぞれ皮下注射し、最終注射から 20 時間後にと殺剖検して卵管を取出

The effect of sow's pituitary gonadotropins on hypovaria of dairy cows.

TAKEISHI, Masatoshi, Toru NAGAI, Toyozo HARADA, Yoshihide NISHI, Tadashi TSUNEKANE & *Kameo NAKANOWATARI (College of Agriculture & Veterinary Medicine., Nihon University, Tokyo 154 & *Teikokuzoki Pharm. Co. Ltd., Kawasaki)

Jap. J. Animal Reprod. 15 (4), 1970.

し、卵子の有無の検索と併せ、解剖顕微鏡で卵巣をしらべ出血並びに黄体の有無を検査した。

判定は、1 群中 60 % 以上に排卵反応を認めた場合を陽性とし、1 R. Ov. U. とした。

(iii) フリードマン反応

健康で成熟した体重 2~3 kg の家兎を 1 群 5 羽として 15 羽を用い、A. P. G. をそれぞれ 50, 100 および 200 μ g を耳静脈から注射し、最終注射 48 時間後に開腹し、卵巣をとり出し黄体または出血卵胞の有無をしらべ、黄体または出血卵胞を 1 群中に 50 % 以上認めたものを陽性とした。

(iv) 幼若マウス子宮重量法

体重 6.5~8 g までの dd 系雌マウス 25 匹を 1 群 5 匹として、1 日 2 回 3 日間にわたって、A. P. G. 500, 1,000 および 2,000 μ g を皮下注射し、5 日目に剖検した。

子宮重量はトーションバランスで秤量し、判定は子宮重量が 20 mg 以上になったものを陽性とした。

3) 供試牛

茨城県東茨城郡美野里町および西茨城郡友部町の酪農家で飼養されている乳用牛で、経産牛 35 頭、未経産牛

1 頭の計 36 頭を供試した。

これらの牛は過去において A. P. G. を全く投与したことのない例で、そのうち 30 頭は HCG または PMSG を投与した経験のある牛で明らかに卵巣機能減退と診断された牛である。

これらに、A. P. G. をそれぞれ 5, 10, 20 および 30 mg を使用時滅菌生理食塩液 5 ml に溶解し、皮下または静脈注射し、それぞれ 1 回投与により効果の判定を行った。

実験成績

1) A. P. G. の生物学的検定

(i) 下垂体摘出幼若雄ラットの生殖腺重量反応

a) 精巣重量: A. P. G. 250 μ g の投与で対照群に比較して 913 % の増量をしめし、これを 100 % 増量に換算すると約 27 μ g 投与で対照に比較し 100 % の増量をしめすことになった。

また、250 μ g と 500 μ g との間には全く変化はみられず、1,000 μ g で多少増量し、2,000 μ g でも増量が認められた。

組織学的には primary spermatocyte がみられた。

Table 1. Body and genital organ weight of immature male rats injected with sow A. P. G. (mean $\pm$ s.d.)

Total dose of A. P. G.	Body weight (g)	Testis (mg)	Seminal vesicle (mg)	Prostate (mg)
Control	52.7 $\pm$ 1.05	15.8 $\pm$ 8.21	5.5 $\pm$ 0.22	11.5 $\pm$ 1.78
250 μ g	53.4 $\pm$ 1.08	160.0 $\pm$ 37.76	5.4 $\pm$ 0.24	19.4 $\pm$ 2.32
500 "	51.9 $\pm$ 2.04	160.0 $\pm$ 13.09	6.3 $\pm$ 0.42	21.6 $\pm$ 4.13
1000 "	52.9 $\pm$ 1.30	195.7 $\pm$ 23.39	7.3 $\pm$ 0.52	23.6 $\pm$ 2.60
2000 "	54.3 $\pm$ 2.17	232.9 $\pm$ 16.29	7.7 $\pm$ 0.42	24.3 $\pm$ 1.41

b) 前立腺重量: A. P. G. 250 μ g で対照に比較して 69%, 500 μ g では 88% の増量を認めた。

1,000 μ g で 105 % の増量を認め、これを換算すると、952 μ g が 1 Pr. U. となる。

c) 精囊腺重量: A. P. G. 500 μ g で対照に比較して 38% の増量を示したに過ぎず、1,000 μ g でも 33%, 2,000 μ g で対照に比し 40% の増量がしめされたにすぎなかった。

(ii) ラット排卵反応

A. P. G. 10 μ g では排卵反応は 20%, 25 μ g では 66.7 % をしめし、25 μ g がほぼ 1 R. Ov. U. であった。

さらに、A. P. G. 投与量の増量に平行して排卵率も

増加し、50 μ g では 85%, 100 μ g では 100% のものに排卵反応がみられた。

(iii) フリードマン反応

A. P. G. 50 μ g で 40% に排卵をみとめ、100 μ g では 90% に排卵みとめた。

これを 60% に換算すると、67 μ g が 1 Rab. U. である。

さらに、200 μ g では 100% に排卵をみとめ、A. P. G 投与量の増量に平行した排卵率の増加がみられた。

(iv) 幼若マウス子宮重量反応

A. P. G. 500 μ g では、12.6 $\pm$ 1.4 mg であったが、1,000 μ g では 20.4 $\pm$ 2.6 mg と陽性所見がみとめられ

Fig. 1. Induced ovulation by single injection of sow A. P. G.

Fig. 2. The dose response line of uterine weight reaction in dd mice by injection of sow A. P. G.

た。

また、2,000 µg では、 22.8 ± 1.7 mg であった。なお対照の子宮重量は 9.6 ± 0.6 mg であった。

2) 卵巣機能減退牛に対する A. P. G. の効果

Table. 2 に示したように、A. P. G. 5 mg の静脈注射では12頭中9頭(75%)が治癒、受胎した。

10 mg の静脈注射では、9頭中7頭(77.7%)に治癒、受胎を認めた。

20 mg では静脈注射により7頭中6頭(85.6%)が治癒し全例が受胎し、分娩した。皮下注射では、5頭中4頭(80%)が治癒、受胎した。

30 mg の静脈注射では3頭全例が治癒、受胎した。

A. P. G. 投与後の発情は2日から17日の範囲でみられ、受胎までの経過では、授精回数が平均1.1回、受胎までの日数は平均28.5日であった。

考 察

芝浦と畜場で採取した主として中型ヨークシャの雌豚の下垂体から抽出した A. P. G. の生物学的性状は、前立腺重量反応 (total prostate) では A. P. G. 952 µg で 1 Pr. U. をみとめた。

Armour の sheep LH¹³⁾ では ventral prostate 重量法で 40 µg で、さらに HCG¹⁵⁾ においては 0.1~0.2 M. U. が 1 Pr. U. であったと報告している。

このように、A. P. G. の ICSH 作用は Armour の sheep LH の約 1/24 であるが、測定方法が異なるため sheep LH に比し 1/24 以内の割合であろうと推察される。

しかしながら、精巣重量反応では A. P. G. 27 µg で対照に比し 100% の増加をみとめ、Armour の sheep LH¹³⁾ では 500~1,000 µg で、さらに HCG¹⁵⁾ は 1 M. U. で 100% 増加をみとめており、ともに ICSH 作用に比し FSH 作用は弱いようであるが、A. P. G. では逆に FSH 作用の方が ICSH 作用よりも強いことが推察された。

Table 2. Effects of treatments with sow A. P. G. on hypovaria cows

Total dose of A. P. G.	Subcutaneous injection		Intravenous injection		Recovery	Pregnant
	Recovery	Pregnant	Recovery	Pregnant		
5 mg			9/12 (75%)	9/9 (100%)	9/12 (75%)	9/9 (100%)
10 "			7/9 (77.7%)	7/7 (100%)	7/9 (77.7%)	7/7 (100%)
20 "	4/5 (80%)	4/4 (100%)	6/7 (85.6%)	6/6 (100%)	10/12 (83.3%)	10/10 (100%)
30 "			3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
Total	4/5 (80%)	4/4 (100%)	25/31 (80.7%)	25/25 (100%)	29/36 (80.6%)	29/29 (100%)

森ら¹⁶⁾も豚下垂体制剤 1 mg 相当量中に FSH 89.15 μ g, LH 8.98 μ g で, FSH の多いことを報告しているが, 逆に VAN DEMARK ら¹⁷⁾は雌豚で LH 作用の強いことを報告している。

本研究での A. P. G. 検定成績では, 森ら¹⁶⁾の報告に相似した成績が得られた。

排卵反応のうち, Friedman 反応では A. P. G. 67 μ g で 1 Rab. U. をみとめ, Vetrophin¹⁸⁾では 1/8 R. U. で 1 Rab. U. をみとめている。

ラット排卵反応では, A. P. G. 25 μ g (37 Rab. U.) が 1 R. Ov. U.¹⁹⁾であったが, Vetrophin¹⁸⁾では約 1/27 R. U. (ともに皮下注射) が 1 R. Ov. U. であった。

これらのことから, A. P. G. および Vetrophin¹⁸⁾ともに Friedman 反応による Rab. U. よりラットの排卵反応 (R. Ov. U.) の方が鋭敏なように推察されたが, いずれにせよこれら排卵での反応の方が他の重量主体の反応より鋭敏であることがうかがえた。

これら A. P. G. を卵巢機能減退牛に対し, 5, 10, 20 および 30 mg をそれぞれ静注 (1 部皮下注併用) したところ, 80% 以上のものに有効で, とくに 5 mg で檜垣^{3,4)}の卵巢実質内注射法と余り差異はみられなかった。

このことから, A. P. G. の非投与の卵巢機能減退牛に対して A. P. G. 5 mg の静注で治療効果のあることがうかがえた。

結 論

と畜場において主として中型ヨークシャ種雌豚から採取した下垂体前葉の A. P. G. 抽出物の性状は次の通りであった。

(1) A. P. G. の 952 μ g が 1 Pr. U. であったが, 精巢重量反応の方が精囊腺重量反応より鋭敏で 27 μ g で対照精巢重量に対し 100% の増加を示した。

(2) A. P. G. 25 μ g が 1 R. Ov. U. で, 67 μ g は

1 Rab. U. であった。

(3) 卵巢機能減退牛に対して, A. P. G. 5 mg 以上の静脈注射によりかなり高い治療効果を認めた。

なお本稿の概要は 1965 年第 59 回日本獣医学会において発表した。
(1969. 9. 11 受付)

文 献

- 1) 武石 (昌)・大久保 (忠)・常包 (正)・福田 (陽)・中野渡 (亀): 東京獣畜会誌, **15**, **16**, (合併号), 20, 1966.
- 2) 芦田 (淳)・清水 (信)・阿部 (徳)・上野 (明)・谷中 (正): 日獣医, **23** (附), 454, 1962.
- 3) 檜垣 (繁)・菅 (徹)・藤崎 (尚)・原 (茂)・本田 (一): 日獣医, **22** (附), 466, 1960.
- 4) 檜垣 (繁): 日獣会誌, **17**, 535, 1964.
- 5) 蘭守 (竜)・中間 (実)・斎藤 (千)・小野寺 (強)・村山 (耕)・矢田 (貞): 日獣医, **23** (附), 441, 1961.
- 6) ROBERTS, S. T.: *Cornell Vet.* **45**, 495, 1955.
- 7) 山下 (明)・白岩 (堯): 日獣会誌, **18**, 248, 1965.
- 8) 吉田 (信): 日獣会誌, **16**, 245, 1963.
- 9) 今道 (友)・三浦 (豊)・小笠 (晃)・須川 (章)・本好 (茂): 日獣医, **25** (附), 510, 1963.
- 10) 中原 (達)・山内 (亮)・片岡 (敏): 本誌, **7**, 27, 1962.
- 11) ———: 本誌, **7**, 32, 1962.
- 12) 常包 (正)・武石 (昌)・永井 (享)・原田 (豊): 日獣医, **25** (附), 512, 1963.
- 13) 今道 (友)・江藤 (禎): 本誌, **6**, 127, 1961.
- 14) ———: 本誌, **7**, 103, 1962.
- 15) ———: 本誌, **6**, 115, 1961.
- 16) 森 (純)・檜垣 (繁): 昭和 41 年度秋季家畜繁殖研究会発表.
- 17) HAFEZ, E. S. E.: *Reproduction in Farm Animals*, pp. 13, Lea & Febigar, Philadelphia 1968.
- 18) 今道 (友)・三浦 (豊): 本誌, **9**, 115, 1964.
- 19) ———: 本誌, **8**, 127, 1963.

Summary

The biological assay of A. P. G. was conducted on the extract of 4,000 sow hypophysis collected at the slaughter house.

The results obtained by the Imamichi's method, using the hypophysectomized immature male rat, indicated that the activity of 952 μ g of sow A. P. G. extract was equivalent of 1 prostate Unit. And testicular weight of hypophysectomized male rat injected with 27 μ g of sow A. P. G. extract was 2 times as compared with that of the control animal.

The activity of 25 μ g of sow A. P. G. extract was equivalent to 1 R. ov. U. by adult female rat ovulation inducing reaction and 67 μ g of the extract was determined to be 1 Rab. U. by Friedmann reaction.

Moreover, on the mouse uterine weight reaction, 20 mg increase was obtained by injecting 1,000 μ g of the extract.

For the treatment to ovarian dysfunction in the cow, effect was obtained with 5 mg of the extract by intravenous injection.