抗絨毛性性腺刺激ホルモン血清による絨毛性性腺刺激 ホルモンの生殖器反応の遮断について

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)

幼若雌マウスの絨毛性性腺刺激ホルモン (HCG と略) 製剤に対する卵巣の出血卵泡・黄体形成反応, 並びに子宮重量反応は HCG の生物学的検定法として用いられている¹⁻³⁾。

しかしながら, HCG 作用により誘起する卵巣の出血卵泡・黄体形成反応, 並びに子宮重量反応について, HCG の作用時間と各生殖器反応の発現との関係は明らかにされていない。

著者らは, HCG の作用時間と各生殖器反応が発現する相互の関係を明らかにすることは, HCG に対する生殖器反応の発現機構を解析するために, また, HCG に対する生物検定の精度を高めるために必要であると考え

る。そこで, まず, HCG 単一皮下注射に対する幼若雌マウスの生殖器反応の経時的变化, 並びに用量反応について検討し, 次いで, 抗絨毛性性腺刺激ホルモン血清 (抗 HCG 血清と略) によって, HCG 作用を遮断し, HCG の作用時間と各生殖器反応の発現との関係を検討したので, その結果を報告する。

実験材料と方法

HCG: HCG は国際単位 (I. U.) 表示の動物用 HCG 標準品 (農林省動薬検) を供試した。各 HCG 溶液の所要濃度は滅菌生理食塩液で溶解, 希釈して調製した。

免疫血清: 抗原として, HCG 1 mg, 2500 I. U. の標品を用いた。免疫ウサギ血清の作成は, HCG 1 mg を生理食塩液 1 ml に溶解し, これに Complete Freund's Adjuvant 1 ml, ペニシリン 100 単位, ストレプトマイ

シン 100 mg を添加し, 成熟雄ウサギの腎部筋肉内に注射した。毎週 1 回, 7 回反復注射をおこなった。最終注射後, 10 日目に試験採血し, 血清 0.2 ml 中, 中和抗体価が 8 単位以上を示すウサギから全採血した。免疫ウサギ血清 (抗 HCG 血清) は分離後, -10°C に凍結保存した。

試験動物: dd 系の幼若雌マウスを供試した。

実験方法: 生理塩食液並びに各濃度の HCG 溶液を各試験群のマウス 1 匹につき 0.2 ml を 1 回, 腹部皮下に注射した。注射後, (1) では, 24 時間間隔, (2) では, 96 時間で解剖し, 腔開口反応, 卵巣の出血卵泡・黄体形成反応を観察し, 卵巣および子宮重量を測定した。腔開口反応は腔の開口をもって陽性とし, 出血卵泡・黄体形成反応は卵巣に出血卵泡, 黄体の出現をもって反応陽性とした。卵巣および子宮重量の測定においては, 周囲の附着組織を除去し, 子宮では子宮角を切断し, 貯溜液を濾紙で吸着除去した後に測定した。

中和抗体価の測定: 抗 HCG 血清 0.2 ml を幼若マウスの腹部に 1 回皮下注射し, 1 時間後に HCG 1.5 I. U. 0.1 ml ずつ 1 日 2 回, 2 日間 6.0 I. U. を鼠径部皮下に注射した。HCG 第 1 回注射後 96 時間目に解剖をおこない, 卵巣の出血卵泡・黄体形成反応を観察し, 子宮重量を測定した。HCG 6.0 I. U. に対する生殖器反応を完全に阻止し, 対照の生理食塩液に対すると同じ結果を示す抗 HCG 血清 0.2 ml の力価を 1 中和抗体価とした。

HCG 作用の遮断試験: HCG 20 I. U. 0.2 ml を 1 回, 左側腹部に皮下注射した後, (3) では, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 時間目に抗 HCG 血清 0.2 ml (4 中和抗体価) を右側腹部に 1 回皮下注射した。(4) では, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 時間目に抗 HCG 血清 0.2 ml (4 中和抗体価) を右側腹部に 1 回皮下注射した。(3), (4) とともに, HCG 注射後 96 時間目に解剖をおこなった。

Effects of the Anti-HCG serum to the HCG action in dd mice.

KUBOMICHI, Morio, Takayoshi INO* & Katsuo SUZUKI (National Veterinary Assay Laboratory, Kokubunji, Tokyo 185, & *National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo 187)

Jap. J. Animal Reprod. 18 (4), 1973.

実験結果と考察

1. HCG 単一皮下注射に対する生殖器反応の経時的変化

表 1 は、生理食塩液並びに HCG 20 I. U. を単一皮下注射後、0 から 144 時間における腔開口反応、卵巢の出血卵泡・黄体形成反応、並びに卵巢および子宮重量反応値を示す。

生理食塩液に対する腔開口反応は、注射後不規則な陽性率を示したが、出血卵泡・黄体形成反応は 144 時間まで発現せず、卵巢重量の平均値は 3~6 mg、子宮重量の平均値は 6~12 mg であった。

HCG に対する腔開口反応は 48 時間までみられず、96 時間で高い陽性率を示した。出血卵泡・黄体形成反応は、48, 72 時間と陽性率は高まり、96 時間で高い反応値を示したが、144 時間では低下した。卵巢および子宮重量は 72, 96 時間で漸増したが、120 時間以降激減した。

次いで、HCG に対する各生殖器反応の発現について、相互の関係を比較した。

24 時間では、出血卵泡・黄体形成反応はみられず、卵巢および子宮重量の増加も認められない。しかし、48 時間において、出血卵泡・黄体形成反応は 1/7 に発現し、

子宮重量も増加した。このことは、HCG に対する卵巢ホルモンの生産・分泌作用は 24~48 時間から誘起されるとみられる。また、96 時間において、出血卵泡・黄体形成反応は高い陽性率を示し、卵巢および子宮重量も著増したが、120 時間以降反応値は激減した。この 120 時間以降における出血卵泡・黄体形成反応の低下は卵泡内出血の吸収、黄体の退行変性等の修復機構によるものとみられる。また、子宮重量の減少は卵巢ホルモンの生産・分泌作用が 120 時間以前に激減することを示すものとみられる。なお、卵巢重量反応は子宮重量反応と異なり出血卵泡・黄体形成、間質の増殖、卵巢ホルモンの生産・分泌と質的に異なった反応が惹起するので、卵巢重量の経時変化に対しては詳細に検討することが必要であると考える。

2. HCG 単一皮下注射に対する生殖器反応の用量反応

次に、HCG 単一皮下注射で、注射後、反応値の高まる 96 時間に解剖し、HCG 各用量に対する生殖器反応について検討した。

表 2 は、その結果を示す。測定に用いた幼若マウスの注射時、解剖時の体重は各 HCG 用量間で、それ程大きい差はみられない。各 HCG 用量に対する各生殖器反応について、腔開口反応は生理食塩液に対し 38%, 2.5

表 1. HCG 20 I. U. 単一皮下注射による生殖器反応の経時変化

注射後の時間	マウス数	解剖時体重	解剖時腔開口	出血卵泡・ 黄体形成反応	卵巢重量	子宮重量
HCG 処理群		g	%	%	mg	mg
0	7	9.20±0.52*	0	0	4.07±0.94*	8.84± 2.48*
24	7	8.93±0.68	0	0	3.63±0.45	9.97± 3.38
48	7	9.69±1.12	0	14.3	3.96±1.50	19.07± 6.69
72	7	11.50±1.12	28.6	71.4	7.06±2.01	35.06±11.31
96	7	11.60±0.80	100.0	100.0	8.01±1.68	37.51± 8.98
120	7	11.89±0.98	85.7	85.7	4.64±1.20	30.00± 7.35
144	7	12.64±1.95	100.0	57.1	6.47±1.82	21.67± 6.09
生理食塩液処理群						
24	7	8.67±0.75	0	0	3.10±0.95	6.34± 0.47
48	7	9.63±1.96	14.3	0	3.70±1.47	8.90± 2.41
72	7	10.74±0.50	0	0	5.01±1.37	9.07± 1.81
96	7	11.41±1.30	0	0	4.77±1.68	8.97± 1.36
120	7	11.33±0.85	14.3	0	6.23±1.34	10.73± 2.99
144	7	12.54±0.71	4	0	5.29±2.21	11.69± 2.34

注: * 平均値±標準偏差

表 2. HCG 単一皮下注射による生殖器反応の用量反応

HCG 用量 (I. U.)	マウス 数	注射時体重	注射時 腔開口	解剖時体重	解剖時 腔開口	出血 汚 胞・ 黄体形成反応	卵巢重量	子宮重量
		g	%	g	%	%	mg	mg
生理食塩液	29	8.95±0.65*	0	13.02±1.32*	37.9	0	3.66±1.00*	12.18±2.70*
2.5	29	8.76±0.54	0	12.53±0.90	82.8	27.6	4.51±1.69	15.70±1.91
5.0	28	8.95±0.69	0	12.99±1.17	99.3	64.3	4.53±1.49	17.83±5.91
10.0	30	9.05±0.63	0	12.91±0.32	96.7	83.3	5.42±2.43	21.55±7.21
20.0	27	9.00±0.81	0	12.40±0.98	96.3	85.2	5.59±2.27	22.40±6.25

注: * 平均値±標準偏差

I. U. で 73% の反応陽性率を示した。出血汚胞・黄体形成反応は生理食塩液に対し反応はみられず、HCG 2.5~10.0 I. U. で用量に対して反応陽性率は高まった。しかし、卵巢重量は用量に対して漸増しなかった。子宮重量反応は卵巢重量反応と異なり、HCG 2.5~10.0 I. U. で用量に対し反応値は高まった。

次いで、2.5~10.0 I. U. に対する出血汚胞・黄体形成反応並びに子宮重量反応について、プロビット法および要因分析法で検討した。出血汚胞・黄体形成反応では、プロビット回帰直線 $Y=2057x+3.46$ が得られた。この回帰式から得られる理論値と期待値は 0.2 以下であるので近似とみられる。直線性の検定では、 $\chi^2_{cal}=0.34<\chi^2_{11}(0.05)=3.84$ ($P=0.8\sim0.5$) で直線性は否定されない。すなわち、この用量範囲における本反応の感度は正規分布しているとみられる。子宮重量反応について要因分析法で検討した結果、回帰は有意性 ($P=0.01$ 以下) を示し、回帰からの偏りは ($P=0.20$ 以上) で有意ではなかった。また、回帰直線 $Y=0.78x+13.81$ が得られ、回帰係数は $t=3.03$ ($P=0.005$ 以下) で有意性が認められた。このことは、HCG に対する卵巢巣ホルモンの分泌は、この用量範囲において定量的に増加するとみられる。

なお、この HCG 単一皮下注射による生殖器反応の結果を、先に報告^{2,3)} した 4 回皮下注射の結果と比較すると、出血汚胞・黄体形成反応並びに子宮重量反応は、単一皮下注射の 2.5, 5.0, 10.0 I. U. と、4 回皮下注射の 1.5, 3.0, 4.5 I. U. の反応値とが、ほぼ等しいものとみられ、4 回皮下注射法は単一皮下注射法に比較して、HCG 用量比で 1.7~2.2 倍、反応の感受性が高まるとみられる。

3. HCG の性腺刺激作用に対する抗 HCG 血清の効果

HCG 20 I. U. 単一皮下注射後、0~60 時間まで 10 時

間間隔で抗 HCG 血清を単一皮下注射し、各生殖器反応の発現について検討した。表 3 はその結果を示す。表に示すように、0, 10 時間区では、HCG の性腺刺激作用が抑制された。20 時間区では、黄体形成反応が 3/5 に発現した。しかし、出血汚胞反応並びに子宮重量反応はみられなかった。30 時間区では、腔開口反応が 5/5、黄体形成反応が 5/5、出血汚胞反応が 1/5 にみられた。しかし子宮重量反応はみられなかった。40 時間区では子宮重量反応がみられ、50, 60 時間区では HCG に対する抗 HCG 血清の抑制作用はみられなかった。

この結果は、HCG に対する黄体形成反応の誘起には 20 時間前後、出血汚胞反応の発現には 30 時間前後、さらに、子宮重量反応の惹起は 40 時間前後、HCG が作用することを要するとみられ、HCG に対する各生殖器反応の発現する段階を 10 時間前後の間隔で遮断できることが見出された。

4. HCG による卵巢の出血汚胞・黄体形成反応に対する抗 HCG 血清の効果

HCG に対する出血汚胞・黄体形成反応の発現する時間的関係をさらに追求するため、0~27 時間まで 3 時間間隔で検討を加えた。表 4 はその結果を示す。表に示すように、12 時間区まで HCG の性腺刺激作用は抑制された。しかし、15 時間区では黄体形反応が 1/5 に発現し、21 時間区では 5/5 に反応が誘起された。出血汚胞反応は 21 時間区までみられず、24 時間区では 1/5、27 時間区では 2/5 に反応が誘起された。子宮重量反応は 27 時間区まで反応はみられなかった。

この結果は、HCG に対する黄体形成反応は HCG が 15 時間前後作用することにより、その発現機構が統御されるとみられる。また、出血汚胞反応の発現には 24 時間前後 HCG の作用することが必要であるとみられる。

LUNENFELD ら⁴⁾ は、幼若マウスの卵巢における HCG

表 3. HCG 作用に対する HCG 抗血清の効果

用量と時間	マウス数	注射時体重	注射時腔開口	解剖時体重	解剖時腔開口	黄体形成	出血	卵巣重量	子宮重量
		g	%	g	%	%	%	mg	mg
生理食塩液	5	8.56±0.44*	0	11.90±1.29*	0	0	0	4.42±1.50*	9.28±2.83*
HCG 20 I. U.	5	8.56±0.36	0	11.32±0.36	100	80	60.0	4.40±1.52	22.16±6.32
抗 HCG 血清注射区									
0	5	10.38±0.82	0	13.90±0.81	60	0	0	5.96±2.06	15.58±4.24
10	4	8.90±0.64	0	12.40±0.32	50	0	0	4.05±1.78	13.78±2.49
20	5	8.44±0.42	0	11.50±0.98	40	60	0	3.76±1.67	11.76±3.19
30	5	10.38±0.39	0	13.68±0.77	100	100	20.0	3.94±0.82	14.00±3.81
40	5	9.20±0.37	0	12.00±0.63	100	100	60.0	6.50±2.59	19.98±3.61
50	4	8.15±0.24	0	11.48±0.62	100	100	50.0	6.08±0.97	21.73±1.43
60	5	8.40±0.40	0	11.40±0.90	100	100	40.0	4.00±2.16	23.62±8.24

注: * 平均値±標準偏差

表 4. HCG 作用に対する抗 HCG 血清の効果

用量と時間	マウス数	注射時体重	注射時腔開口	解剖時体重	解剖時腔開口	黄体形成	出血	卵巣重量	子宮重量
		g	%	g	%	%	%	mg	mg
生理食塩液	5	10.02±0.79*	0	13.10±0.74*	40	0	0	4.54±1.62*	13.60±1.83*
HCG 20 I. U.	5	9.44±0.40	0	13.26±0.42	80	100	60	5.18±1.77	36.08±13.34
抗 HCG 血清注射区									
0	5	10.38±0.82	0	13.90±0.81	60	0	0	5.96±2.06	15.58±4.24
3	5	9.90±0.62	0	12.43±1.16	40	0	0	3.48±0.68	14.53±0.94
6	5	9.70±0.99	0	12.44±1.04	20	0	0	5.86±1.24	15.78±2.37
9	5	9.64±0.39	0	12.20±0.82	80	0	0	3.26±0.90	11.60±3.31
12	5	9.58±0.72	0	12.70±0.94	20	0	0	4.15±1.28	12.75±1.63
15	5	8.82±0.59	0	11.92±0.95	40	20	0	3.50±1.00	14.25±3.74
18	5	9.04±0.80	0	11.70±1.09	40	40	0	4.14±1.29	9.50±1.16
21	5	9.74±0.20	0	12.68±0.64	60	100	0	4.04±1.29	13.60±2.93
24	5	10.48±0.56	0	13.12±0.62	80	80	20	5.20±1.87	16.74±4.58
27	5	9.62±0.57	0	13.22±1.26	100	100	40	4.62±1.13	14.86±3.06

注: * 平均値±標準偏差

の取り込みは、他の臓器に比較して高く、さらに、1 回注射後 90 分～12 時間で高く、24 時間では激減すると報告している。また、抗 HCG 血清を同時に注射すると、卵巣への取り込みはみられないとしている。森⁵⁾もウサギに牛 LH 免疫血清を排卵刺激前に注射すると内因性 LH が不活化され、排卵は阻止されるとしている。

しかし、尾崎ら⁶⁾は、HCG が有意に卵巣へ集積する

ことは認められないが、卵巣への ¹⁴C-Valine の取り込みは 6～8 時間で高まり、その後、約 6 時間程一定の水準を維持した後漸減したとし、HCG は細胞膜の active transport 機構によって標的臓器へ多量に移行することから、細胞内へ移行後特異な receptor と結合することによって作用が発現するものと推測している。

しかしながら、HCG の卵巣への取り込みをはじめ、

HCG に対する receptor の立証、作用発現についての機構の解明には、さらに詳しい研究が必要である。

HCG の作用時間と排卵について、笹本⁷⁾は PMSG 前処理後、HCG 追注による方法で検討し、HCG 注射後、抗 HCG 血清を 3 時間後に静脈内注射した場合、排卵は抑制できないとしている。

しかし、この結果においては、HCG に対する卵巢の黄体形成反応の発現には 15 時間前後、出血卵泡反応では 24 時間前後、HCG の作用を要することから、出血卵泡・黄体形成反応と排卵反応とは同一機構によって発現するのではなく、異なった内分泌作用点によるものとみられる。

LUNN⁸⁾は、性腺刺激ホルモンに対する幼若ラットの出血卵泡と排卵の関係について検討し、PMSG 高用量に対して、卵巢に出血卵泡を惹起するが排卵は起こらず、PMSG 低用量では、排卵は起こるが出血卵泡は発現しないとしている。

Estrogen に対する子宮重量反応について、ASTWOOD⁹⁾は estradiol 0.1 μ g を幼若ラットに 1 回皮下注射後、子宮重量を測定し、6 時間で 1 つの小さい peak と、27~30 時間に 1 つの大きい peak を示すとしている。

また、MARTIN¹⁰⁾は estrone 0.0001 μ g をマウスの腔内に 1 回投与後、腔上皮の tetrazolium 還元能を測定し、12~30 時間で直線的に tetrazolium 還元能が増加するとし、HORI¹¹⁾も estradiol-17 β 0.03 μ g を去勢マウスに 1 回皮下注射後、腔内 tetrazolium 還元能は 18 時間から急激な増加が起こり、27 時間でほぼ最大値を示すとしている。

これらの結果は、estrogen に対する子宮並びに腔上皮の反応は 27~30 時間において peak を示すとみられる。

著者らの HCG に対する子宮重量反応の発現においては、estrogen の子宮、腔上皮に対する作用とは異なり、卵巢を介する反応であるが、HCG に対して抗 HCG 血清を 30 時間までに注射すると子宮重量反応の発現が抑制されることから、HCG に対する子宮重量反応の誘起には、40 時間前後 HCG の作用することが必要であるとみられる。

要 約

絨毛性性腺刺激ホルモン (HCG と略) の作用時間と

幼若雌マウスの卵巢の出血卵泡・黄体形成、並びに、子宮重量反応が誘起する相互の関係を明らかにする目的で、抗絨毛性性腺刺激ホルモン血清 (抗 HCG 血清と略) による HCG 作用の遮断試験をおこなった。得られた主な結果は次のものである。

1) HCG 単一皮下注射に対する出血卵泡・黄体形成反応並びに子宮重量反応は 72~96 時間で高い反応値を示したが、120 時間以降、反応値は激減した。

2) HCG 単一皮下注射に対する出血卵泡・黄体形成反応は 2.5~10 I. U. の用量で $Y = 2.57x + 3.46$ のプロビット回帰直線が得られ、直線性は否定されなかった。子宮重量反応は 2.5~10 I. U. の用量で $Y = 0.78x + 13.81$ が得られ、直線性並びに回帰係数は高い有意性を示した。

3) HCG に対する生殖器反応の遮断試験をおこなった。HCG に対する黄体形成反応は 20 時間区、出血卵泡反応は 30 時間区、子宮重量反応は 40 時間区から発現した。さらに、出血卵泡・黄体形成反応について 3 時間間隔で検討した結果、黄体形成反応は 15 時間区、出血卵泡反応は 24 時間区から惹起した。

本報告の要旨は第 70 回日本獣医学会で発表した。

(1972. 5. 30 受付)

文 献

- 1) 佐藤(繁)・小野(元)・星(冬): 本誌, 2, 115, 1957.
- 2) 窪道(護)・猪(貴)・鈴木(勝): 本誌, 14, 53, 1968.
- 3) 窪道(護)・猪(貴)・鈴木(勝): *Ann. Rep. Nat. Vet. Assay, Lab.*, 7, 83, 1970.
- 4) LUNENFELD, B. & A. ESHKOL: *Vitamin & Hormone*, 25, 137, New York, 1967.
- 5) 森(純): 本誌, 16, 1, 1970.
- 6) 尾崎(公)・倉智(敬): 日内分泌誌, 47, 226, 1971.
- 7) 笹本(修): 日獣医学誌, (学会号), 26, 1964.
- 8) LUNN, S. F.: *Recent Research on Gonadotrophic Hormone*, Ed. E.T. BELL & J.A. LORAIN, Livingstone, London, 1967.
- 9) ASTWOOD: *Hormone Assay*, Ed. C. W. EMMENS Academic, New York, 1950.
- 10) MARTIN, L. & P. J. CLARINGBOLD: *J. Endocri.*, 20, 173, 1960.
- 11) HORI, K.: 日内分泌誌, 40, 1099, 1964.