成熟および幼若ラットの排卵に及ぼす合成 LH-Releasing Hormone (LH-RH) の影響

梅 津 元 昭・三浦源三郎・竹 内 三 郎

(東北大学農学部)

LH-RH が実験動物の排卵を誘起することが最近知られている¹⁻⁸⁾。ラットにおいては排卵の誘起に発情前期における排卵ホルモンの放出を中枢神経抑制剤により抑制した成熟ラットに対して LH-RH を用いている報告が多い^{1-3, 6-8)}。しかし幼若ラットに LH-RH を用いて排卵を生じさせた報告は少ない。

本報告では成熟ラットでは発情後期、休止期のもの、幼若ラットでは PMS 前処理後アンチエストロジェンであるネムブタール処理したものに LH-RH を注射し排卵への影響を検討した。LH-RH として、天然に存在するデカペプチドの合成品とレナペプチドで FSH および LH の放出作用がより強力なものとして開発された合成品との 2 種を用い、その力価の比較検討も合わせて行なった。

方 法

ラットは当研究室で累代繁殖している Wistar 系雌ラットを用いた。成熟ラットは体重 200~300 g の未経産で少なくとも 2 回以上正しく 4 日の性周期を示したものをを用いた。LH-RH は発情休止期または発情後期の午後 2 時に 0.5 ml の生理食塩液に溶かして大腿部静脈に注射した。発情休止期のラットの一部のものは皮下に注射した。これらのものは注射後翌日に殺し卵管膨大部内の卵子を実体顕微鏡下で数えた。発情後期に注射したものは、翌日殺したものの他に LH-RH 注射後さらにスミアをとり続け注射後 4 日目に殺した群をもうけた。

幼若ラットは 24~27 日令で体重 50~65 g のものをを用いた。PMS [セロトロピン (帝国臓器)] 3 IU を午前 9:30~10:00 に皮下注射した。クロミヘン処理群では

PMS 注射 6 時間後にクロミヘン (Clomiphene citrate: transcis 混合型) 5 mg/100 g b.w. を 30% エタノール溶液として皮下注射した。ネムブタール処理群では PMS 注射後 49~50 時間 (午前 11~12 時) にネムブタール 4 mg/100 g b.w. を皮下注射した。両群とも LH-RH を PMS 注射後 52 時間 (午後 2 時) に静注し、翌日 (PMS 注射後 72 時間) に殺して卵管内卵子を検索した。

LH-RH に関しては合成デカペプチドアミド [pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂]: (Gn-RH) とノナペプチド [des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-ethylamide⁹⁾]: (Gn-RH-I) の 2 種を用いた。

結 果

1. 成熟ラットに及ぼす LH-RH の影響

発情休止期では (Table 1), Gn-RH 0.2 μ g の静注では排卵は全くみられなかったが, 2 μ g 以上では全てに排卵がみられた。Gn-RH-I では 0.02 μ g では全く排卵がみられなかったが, 0.2 μ g 以上の処理では全てに排卵がみられた。Gn-RH, Gn-RH-I をそれぞれ皮下注射した時は静注のときとはほぼ同様の排卵反応を示した。

発情後期における LH-RH の静注では (Table 2), Gn-RH-I の 10 μ g のもので注射の翌日に殺したが全く排卵がみられなかった。注射後のスミアへの影響をみたところ, Gn-RH 10 μ g 以下および Gn-RH-I 0.2 μ g 以下の処理では全く影響がみられなかった。Gn-RH 50 μ g および Gn-RH-I の 2 μ g 以上の処理では全てスミアに乱れが生じ, 注射後スミアの発情期像の出現が予定より 1 日遅れた。これらのものは発情期像の出現日に殺して卵管膨大部の卵子を調べたところ全てに排卵がみられた。Gn-RH-I 10 μ g 処理でさらにその後の性周期を調べたところ, すぐに 4 日周期にもどった。

2. 幼若ラットに及ぼす LH-RH の影響

クロミヘン処理群 (Table 3) では, LH-RH 無処理ではほとんどのもので排卵が抑制された。Gn-RH 0.02 μ g 処理では排卵はみられなかったが, 0.2 μ g 以上の処理

The effect of synthetic LH-Releasing Hormone (LH-RH) on ovulation in adult and immature rats.
UMEZU, Motoaki, Genzaburo MIURA & Saburo TAKEUCHI (Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, 980)

Jap. J. Animal Reprod. 20 (3), 1974.

Table 1. The effect of synthetic LH-RH injection on ovulation in adult diestrous rats

Treatment	Dose of LH-RH (μ g)	No. of animals	Ovulation rate	Number of ova
Intravenous injection	Gn-RH 0.2	3	0/3	
	2	2	2/2	7, 8,
	10	3	3/3	4, 4, 3
	50	3	3/3	8, 8, 7
	Gn-RH-I 0.02	3	0/3	
	0.2	3	3/3	6, 5, 8
	2	3	3/3	9, 5, 6
	10	3	3/3	6, 3, 7
Subcutaneous injection	Gn-RH 0.2	3	1/3	2
	2	3	3/3	4, 5, 4
	Gn-RH-I 0.02	2	0/2	
	0.2	3	3/3	8, 6, 7
	2	3	3/3	13, 11, 10

LH-RH dissolved in 0.5 ml saline was injected at 2:00 PM of diestrous rats.

Rats were killed on the following day to examine the ampulla for ova.

Table 2. The effect of synthetic LH-RH injection on ovulation in adult metestrous rats

Dose of LH-RH (μ g)	No.	Vaginal smear (after LH-RH injection)					Ovulation (4 days after LH-RH injection)							
		0	1	2	3	4	Ovulation				No. of ova			
Gn-RH 2	1	M	D	P	E	M	—							
	2	M	D	P	E	M	—							
	10	1	M	D	P	E	M	—						
		2	M	D	P	E	M	—						
	50	1	M	D	D	P-E	E	+	8					
		2	M	D	D	P-E	E	+	13					
		3	M	D	D	P-E	E	+	9					
		4	M	D	D	P	E	+	11					
Gn-RH-I 0.02	1	M	D	P	E	M	—							
	2	M	D	P	E	M	—							
	0.2	1	M	D	P	E	M	—						
		2	M	D	P	E	M	—						
	2	1	M	D	D	P	E	+	8					
		2	M	D	D	P	E	+	9					
	Vaginal smear after LH-RH injection													
	10	1	M	D	D	D	E	M	D	P	E	M	D	P
		2	M	D	D	D	E	M	D	P	E	M	D	P
		3	M	D	D	D	E	M	D	P	E	M	D	P

LH-RH was injected i. v. at 2:00 PM of metestrous rats.

Rats were killed 4 days after the injection to examine the ampulla for ova, except 10 μ g injection of Gn-RH-I.

Table 3. The effect of synthetic LH-RH on Clomiphene-blocked ovulation in PMS-primed immature rats

Dose of LH-RH (μ g)	No. of animals	Ovulation rate	Number of ova
Gn-RH 0	10	1/10	4
0.02	4	0/ 4	
0.2	5	4/ 5	7, 2, 4, 4
2.0	7	4/ 7	6, 6, 4, 9
Gn-RH-I 0.02	5	1/ 5	5
0.2	5	4/ 5	4, 8, 7, 2

PMS (3 IU) was subcutaneously injected at 9:30~10:00 AM.

Clomiphene was treated 6 hrs after PHS injection.

LH-RH was intravenously injected 52 hrs after PMS treatment (2:00 PM) and killed on the next day to check ovulation.

Table 4. The effect of synthetic LH-RH on Nembutal-blocked ovulation in PMS-primed immature rats

Dose of LH-RH (μ g)	No. of animals	Ovulation rate	Number of ova
Gn-RH 0	8	1/8	7
0.2	3	0/3	
2	5	3/5	3, 5, 9
Gn-RH-I 0.02	4	1/5	5
0.2	5	4/5	7, 5, 2, 7

The method was similar to Table 3, but Nembutal was injected 52 hrs after PMS injection instead of Clomiphene.

で高い排卵陽性率がみられた。Gn-RH-I の 0.02 μ g 処理では 1/5 の低い排卵率を示したが、0.2 μ g 処理では高い排卵率を示した。

ネムブタール処理群 (Table 4) では、LH-RH 無処理では排卵はほとんど抑制された。Gn-RH 0.2 μ g 処理では排卵がみられなかったが、2 μ g 処理では高い排卵率を示した。Gn-RH-I 0.02 μ g 処理ではほとんど排卵はみられなかったが、0.2 μ g 処理では高い排卵率を示した。

考 察

成熟ラットの発情休止期における LH-RH 処理では Gn-RH 2 μ g 以上および Gn-RH-I 0.2 μ g 以上の処理で安定した排卵がみられた。LH-RH の排卵誘起に要する最小有効量は、従来の発情前期に中枢神経抑制剤を用いて排卵を抑制させたラットに排卵を生じさせる量とほぼ同じであった^{3,6,8)}。また、Gn-RH-I は Gn-RH の約 10 倍の力価をもつことが判ったが、これも従来の報告とほぼ一致する^{3,7,8)}。また、Gn-RH-I および Gn-RH

は皮下注射、静脈内注射いずれの場合も同様の作用を示した。これは、これらの LH-RH が体内への吸収が非常に容易であることによるものと推察されるが詳細は不明である。

一方、発情後期の LH-RH 処理では、Gn-RH 50 μ g、Gn-RH-I 2 μ g 以上の処理で、次回の排卵を 1 日遅らせる排卵抑制作用のあることが見出された。

この作用に関しても Gn-RH-I は Gn-RH より強い力価をもっていることが判った。この排卵抑制機構については今のところ不明であるが、興味深いものと思われる。

PMS で前処理した幼若ラットでは、クロミヘンをアンチエストロジェンとして多量に処理して排卵を抑制した時、Gn-RH および Gn-RH-I の 0.2 μ g 以上の注射で排卵がみられた。

梅津^{9,10)} は、先にアンチエストロジェンは、中枢の排卵ホルモン放出機構に働き排卵を抑制するものと推察したが、LH-RH 注射により排卵が生ずることからこの考えがより一歩進められたものと思われる。

PMS-ネムブタール処理の幼若ラットでは Gn-RH 2 μ g, Gn-RH-I 0.2 μ g 以上の処理で排卵がみられた。幼若ラットでも成熟ラットと同様に LH-RH により, 中枢神経抑制剤で排卵が抑えられたものに排卵が誘起され, Gn-RH-I の力価は Gn-RH の約 10 倍高いことが判明した。クロミヘン処理群では Gn-RH と Gn-RH-I の排卵誘起の最小有効量がほぼ同量であり, 本試験の他の結果と異なるがその理由は不明である。

要 約

合成 LH-RH としてデカペプチド・アミド: Gn-RH とノナペプチド: Gn-RH-I の 2 種類を用いて, 成熟および幼若ラットの排卵への影響を調べたところ, 次の結果を得た。

1. 成熟ラット: i) 発情休止期のものでは Gn-RH 2 μ g 以上, Gn-RH-I 0.2 μ g 以上の処理で排卵がみられた。ii) 発情後期のものでは Gn-RH 50 μ g・Gn-RH-I 2 μ g 以上の処理で排卵が予定日より 1 日遅れた。

2. 幼若ラット: i) PMS-クロミヘン処理では Gn-RH, Gn-RH-I の 0.2 μ g 以上の処理で排卵がみられた。ii) PMS-ネムブタール処理では, Gn-RH 2 μ g 以上, Gn-RH-I 0.2 μ g の処理で排卵がみられた。

ここで用いた 2 種の合成 LH-RH は武田薬品工業の小野浩臣氏から提供して戴きました。ここにその御好意

に対して深謝致します。

(1974. 3. 22 受付)

文 献

- 1) ARIMURA, A., A. V. SCHALLY, T. SAITO, E. E. MULLER & C. Y. BOWERS: *Endocrinology*, **80**, 515, 1967.
- 2) ARIMURA, A., H. MATSUO, Y. BABA & A. V. SCHALLY: *Science*, **174**, 511, 1971.
- 3) FUJINO, M., S. KOBAYASHI, M. OBAYASHI, S. SHINAGAWA, T. FUKUDA, C. KITADA, R. NAKAYAMA & I. YAMAZAKI: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 863, 1972.
- 4) 有村 (章)・松尾 (寿)・馬場 (義): 蛋白質核酸酵素, **17**, 479, 1972.
- 5) SCHALLY, A. V., A. ARIMURA & A. J. KASTIN: *Science* **179**, 341, 1973.
- 6) HUMPHREY, R. R., W. C. DERMODY, H. O. BRINK, F. G. BOUSLEY, N. H. SCHOTTIN, R. SAKOWSKI, J. W. VAITKUS, H. T. VELOSO & J. R. REEL: *Endocrinology*, **92**, 1515, 1973.
- 7) FUJINO, M., S. KOBAYASHI, M. OBAYASHI, S. SHINAGAWA, T. FUKUDA, C. KITADA, R. NAKAYAMA & I. YAMAZAKI: *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 488, 1973.
- 8) RIPPPEL, R. H., E. S. JOHNSON, W. F. WHITE, M. FUJINO, I. YAMAZAKI & R. NAKAYAMA: *Endocrinology*, **93**, 1448, 1973.
- 9) 梅津 (元): 本誌, **19**, 1, 1973.
- 10) ———: 本誌, **19**, 87, 1973.

Summary

Effects of 2 synthetic LH-RH (decapeptide amide-p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂: (Gn-RH), nonapeptide—[des-Gly-NH₂¹⁰, Proethylamide⁹]: (Gn-RH-I) on ovulation of adult and immature rats were investigated.

Results obtained were as follows:

1) In adults, LH-RH dissolved in 0.5 ml saline was injected i. v. at 2:00 PM of diestrus or metestrus day.

Rats were killed on the following day after LH-RH injection on diestrus day and on 4 days after the injection of metestrus day to examine the ampulla for ova.

i) Ovulation was observed in rats injected with more than 2 μ g of Gn-RH or more than 0.2 μ g of Gn-RH-I on diestrus day.

ii) When 50 μ g of Gn-RH or more than 2 μ g of Gn-RH-I was injected, ovulation was delayed 1 day.

2) In immature rats aged 24~27 days, 3 IU of PMS was injected s. c. at 9:30~10:00 AM to induce ovulation. Then clomiphene (Clomiphene-citrate: 5mg per 100 g B. W. in 30% ethanol, after 6 hrs of PMS treatment) or Nembutal (4 mg per 100 g B. W., after 49 hrs of PMS treatment) was injected to block ovulation.

i) In clomiphene treated rats, ovulation was induced by more than 0.2 μ g of Gn-RH or Gn-RH-I.

ii) In Nembutal treated rats, ovulation was induced by more than 2 μ g of Gn-RH or more than 0.2 μ g of Gn-RH-I.