ゴナドトロピン連続投与によるアンチホルモン 生産に関する実験的研究 第 II 報 マウスに於ける試験

安田 泰久・高瀬 守史・保坂安太郎

(麻布獣医科大学畜産学教室) (東芝製薬株式会社)

ゴナドトロピンの長期連続投与が、アンチホルモンを誘起し、Gonad の Atrophy を生ずる¹⁻⁸⁾。

このアンチホルモン生産と同時に、下垂体前葉の細胞構成にも著しい変化を生じ、殊に、 β -細胞の増加と、この細胞の典型的な Signet ring cell の出現⁹⁻¹³⁾がみられ、更に、卵巣に於いても、Atrophy の進行に伴つて、Wheel cell が Theca cells に出現する事が報告⁹⁻¹¹⁾されている。

そこで、前報¹⁴⁾に引続き、マウスに、ゴナドトロピン (Pregnancy Mare Serum Gonadotrophin—以下 P. M. S. G., Chorionic Gonadotrophin—以下 C. G., とする) を連続 90 日間注射し、アンチホルモンの生産とこれら下垂体及び卵巣の組織学的検索を加えたので報告する。

実験材料と方法

実験に使用したマウスは、dd-Strain の未成熟雌マウス (体重 7.5~8.5 gr.) 240 匹で、このうち、半数の 120 匹を体重 5.0 gr 前後で去勢し、一定飼料で飼育、前記体重に達した後、ゴナドトロピンの注射を開始した。

実験期間は、昭和 35 年 4 月 10 日から 90 日間で、オリエンタル酵母工業 K. K. の固型マウス用飼料 MF により飼育した。

このマウスを、実験の都合上、次の各群に分けて、注射を実施した。

I.	P. M. S. G. 注射群	正常雌	40 匹
		去勢雌	40 匹
II.	C. G. 注射群	正常雌	40 匹
		去勢雌	40 匹
III.	コントロール群	正常雌	40 匹
		去勢雌	40 匹

Experimental studies on antigonadotrophin formation followed on repeat injection with gonadotrophin. II. Experimental studies on mice. YASUDA, Y., M. TAKASE & Y. HOSAKA (Azabu Vet. College : Toshiba Pharmac. Co.) *Jap. J. Animal Reprod.* 7, (1).

注射に使用したゴナドトロピンは、P. M. S. G. 製品^{*1)}及び C. G. 製品^{*2)}で、連日一定時間に、5 i. u. / 0.1 cc リンゲル液を、頸部皮下に注入した。

尚、この注射は、0.5 cc ツベルクリン注射筒を使用、漏出の防止につとめた。

注射期間は 90 日で、この期間中、1, 30, 60, 90 日にアンチホルモン生産の検定を実施した。

即ち、各群の正常、去勢両区より、at random に 10 匹宛を抽出し、エーテル麻酔でと殺、卵巣を摘出秤量し下垂体、卵巣、及び一部の肝臓の組織学的追求を実施した。

このアンチホルモン生産の検定は、各群の平均卵巣重量を算出、同時期にと殺したコントロール (未注射群の平均卵巣重量との変動によつて、アンチホルモン生産量を測定した。

この卵巣重量の測定は、Bouin 氏液に 1 昼夜固定後、濾紙上で異物を除去、秤量し、その結果を推計処理 ($p = 0.05$) で誤差範囲を棄却、算出した。

下垂体、卵巣、肝臓は、Bouin 固定、5 μ の Paraffin 切片を作製したが、特に下垂体は連続切片を作製した。

この下垂体切片の切断方向は、下垂体の長軸に対する水平切片を採用した。

下垂体の染色は、Haematoxylin-Eosin, Marolly Azan 染色、Kresazan 染色^{15, 16)}を使用し、各個体 2,000 ケの細胞を算え、この比率から、 α, β, γ , 各細胞%を算出した。

一方、卵巣、肝臓は、Haematoxylin-Eosin 染色を採用した。

又、これらの検定直前に各マウスの Vaginal Smear をとり、発情の有無を検査して参考とした。

成績と討議

1) アンチホルモンの生産について

東芝製薬 KK 提供の「セラルモン*1」「ゲストロン*2」を使用した。

前報に於いて、著者等は P. M. S. G. 注射山羊で、58 日目から、アンチホルモンの生産を認め、この山羊血清

Fig. 1. The Changes on the mean ovarian weight of gonadotrophin injected mice.

Talle. 2 The effect of Gonadotrophic Substance on the percentage of cell types in the pituitary gland of immature female mice

Treatment.	No. of mice	B. W. (gr.)	ovarian wt (mg.)	Pituitary cell types		Analysis % Chrom.
				% Acid.	% Baso. (Average)	
PMSG treated normal mice						
1 st to 30 th day	10	21.50	11.62 ± 3.53	20.50	8.10	71.40
1 st to 60 th day	10	23.70	11.28 ± 1.48	17.08	17.15	65.77
1 st to 90 th day	10	24.88	7.27 ± 3.00	18.01	16.68	65.31
PMSG treated Ovariectomized mice						
1 st to 30 th day	10	20.67	—	13.45	29.21	57.34
1 st to 60 th day	10	23.67	—	18.36	22.86	59.70
1 st to 90 th day	10	23.75	—	19.46	22.84	57.70
CG treated normal mice						
1 st to 30 th day	10	21.10	4.77 ± 0.41	21.15	8.91	71.94
1 st to 60 th day	10	23.61	11.40 ± 1.69	20.21	11.22	68.77
1 st to 90 th day	10	24.00	8.11 ± 2.49	17.59	19.37	63.04
CG treated Ovariectomized mice						
1 st to 30 th day	10	21.12	—	19.76	18.87	61.37
1 st to 60 th day	10	23.00	—	19.30	21.99	58.71
1 st to 90 th day	10	23.50	—	17.07	22.02	60.91
Untreated normal mice						
1 st to 30 th day	10	21.15	4.14 ± 1.29	21.63	7.15	71.22
1 st to 60 th day	10	23.74	4.30 ± 0.68	21.76	7.46	70.78
1 st to 90 th day	10	24.01	6.83 ± 0.76	21.57	7.66	70.77
Untreated Ovariectomized mice						
1 st to 30 th day	10	21.04	—	17.65	26.94	55.41
1 st to 60 th day	10	23.40	—	18.90	24.17	56.93
1 st to 90 th day	10	24.15	—	20.01	12.62	67.37

と P. M. S. G. 5 i. u. を同時にマウスに注射 (両側に別途注射) して、マウス卵巣の発育を抑制する事を報告した。

今回、P. M. S. G., C. G., 各 5 i. u. を連続注射した各群マウスの平均卵巣重量の変化は、第 1 図にみられる如くである。

これに依れば、P. M. S. G. 注射群マウスは、30 日目迄、濾胞の成熟、黄体、血液濾胞の形成などに依つて、卵巣重量は著るしい増加を示したが、60 日目の検定では濾胞の新たな形成及び血液濾胞の形成は、みうけられずその重量も少々低下し、その後の卵巣の Atrophy によつて、90 日目の平均卵巣重量では、コントロールマウスの平均卵巣重量と殆ど差がみとめられなかつた。

C. G. 注射群マウスは、未成熟マウスを使用したため C. G. による LH 作用で黄体形成を招く素因が乏しく、30 日目のアンチホルモン検定では、コントロール群マウスとの差がみられなかつた。

しかし乍ら、濾胞の成熟、黄体化、血液濾胞の出現によつて、60 日目の平均卵巣重量は著しい増加を示した。

この様に、C. G. 注射群では、60 日目迄増加するが、90 日目の検定では、P. M. S. G. 群マウス卵巣と同様、Atrophy の兆候が卵巣にみられ、重量も又、極めて著るしい減少を示した。

一方、コントロール群のマウス平均卵巣重量は 1, 30, 60, 90 日と着実に増加する傾向を示した。

これらからみて、P. M. S. G. 5 i. u. 連日注射は 60 日以降から、又 C. G. 5 i. u. 連日注射は、60 日以降から、抑制物質が血清中に出現するものと考えられる。

この抑制物質は、その後 90 日目の検定で、P. M. S. G. 群、C. G. 群の卵巣重量が、コントロールマウスの卵巣重量と殆ど大差のない重量を示した点から、アンチホルモンの作用が、これらのゴナドトロピンの薬理作用

を殆ど抑制するものと思われる。

又、P.M.S.G. 5i.u. の連日注射が、C.G. 5i.u. の連日注射よりも、アンチホルモン出現が早い事を認めたがこれは、P.M.S.G. の血中滞留時間の長い点に起因する事は前報で述べた如くである。

又、Atrophy の甚しい卵巣の Theca cell に Wheel cell の出現がみられたが、これは Hypophyseal deficiency に起因するものと思われるが、Cyst 化の傾向はみられなかつた。

2) 下垂体前葉の細胞構成について

P.M.S.G., C.G., 及びコントロール群の正常、去勢マウスの下垂体前葉の細胞構成比を算出した結果は第1表の如くである。

P.M.S.G. 群正常マウスでは、Basophile cell が注射を反復するにつれて、1 次的な増加の傾向をみせ、30 日目の 8.10% から、60 日目には、17.15% 迄増加した。

この傾向は、C.G. 群正常マウスでもみられ、8.91% から 19.37% と増加を示した。

一方、去勢マウスは、一般に極めて高い Basophile % を示し、コントロール群では、26.94% を示すが、その後の 60, 90 日の測定では漸次低下する。

しかし乍ら、P.M.S.G., C.G. 両群の去勢マウスは、この高い Percentage を実験期間中、相当長期間維持する事がみられる。

これらの Basophile cell percentage の変動は、ゴナドロピンの連続注射で、アンチホルモンが生産し Gonad の Atrophy を生ずるため、この Gonad の機能回復の目的で、ゴナドロピンの過剰分泌を二次的に誘発するこれが、一般に Basophile cell percentage の増加となると思われる。

殊に、去勢による Basophile cell の増加と、アンチホルモン生産とが重複する際には、この Basophile cell の増加が極めて顕著に表われる傾向がみられた。

Basophile cell の増減は、一般に Chromophobe cell の増減と逆比例するものと思われるが、Acidophile cell とは比例関係にあるとは思われなかつた。

Resorcin fuchsin の前処置による Kresazan technique では、Delta cell の識別は不可能で、又切片の切断を水平切片のみに限定したため、Basophile cell の増数部位も、下垂体前葉の辺縁部に顕著な増加を認めるに止つた。

3) アンチホルモン生産マウスの肝臓

本実験で、P.M.S.G., 及び C.G. 両注射群の 60 日 90 日検定（正常及び去勢両区）マウスで、数例、異

常（正常の 1.5 倍）に肥大した肝臓がみうけられた。

この組織学的所見では、肝細胞索の解離と中心静脈のうつ血と、R.E.S. 系の Activation と、Neutrophile の浸潤がみられた。

これは、肝臓が過剰なゴナドロピンの不活化の作用部位として働くためと考えられる。

4) Vaginal Smear について

本実験に供試したマウスは、いずれも未成熟マウスのため、第1日の検定では、P.M.S.G., C.G., コントロール、いずれも休止期状態の Vaginal Smear であつたが、30 日目の検定では、P.M.S.G. 注射群の 70%, C.G. 注射群の 30~40% に発情状態の所見がみられたがコントロール群では、僅々 10% に過ぎなかつた。

その後の所見では、60 日の検定で、P.M.S.G. 注射群の 30~40%, C.G. 注射群の 70~80%, コントロール群の 10~20% に発情がみられ、90 日目では、P.M.S.G., C.G. 両注射群共 20~30% 以下に低下し、コントロール群は、前回と変動がなかつた。

この現象は、ゴナドロピン注射によつて濾胞成熟が行われたため、発情%が増大したが、その後の卵巣反応の衰退（アンチホルモンの生産）と比例して、発情%が低下する事を示している。

ま と め

未成熟雌マウスに、連日、P.M.S.G., C.G., 5i.u. を 90 日間注射した結果、次の成績を得た。

1) P.M.S.G., 5i.u. の連日注射マウスでは、第30日以降から、C.G., 5i.u. 連日注射マウスでは、第60日以降から、アンチホルモンが生産された。

この抑制作用は、注射の継続によつて強化され、90 日目の検定では、P.M.S.G., C.G., 注射群の卵巣重量とコントロール群の卵巣重量と殆ど差がみられなかつた。

2) 下垂体前葉の Basophile cell は、アンチホルモンの生産と共に増加する傾向がみられた。

3) P.M.S.G., C.G. 両注射群の 60, 90 日検定では肝臓肥大がみられた。

又、Vaginal Smear での発情兆候は、アンチホルモン生産と比例するものと思われる。

本研究に実施に当つて御指導戴いた東大小林教授、新谷博士並びに岩手大三浦教授、大島助教授に感謝の意を表すると共に、供試品を提供された東芝製薬に謝意を表します。

(1961.3.8 受付)

文 献

- 1) J. A. M. A. 103, 492, 1934. (Editorials) 2) *ibid.* 109, 362, 1937. (Editorials) 3) COLLIP J. B., H.

- SELYE & THOMSON T.L. : *Biol. Rev.* **15**, 1, 1940.
 4) THOMPSON K.W. ; *Physiol. Rev.* **21**, 588, 1941.
 5) LEATHEN J.H. , *J. Clin. Endocrinol.* **4**, 500, 1944
 6) EVANS H.M. & M.E. SIMPSON, The hormones. II : 390, 1950, Academic Press, N. Y. 7) SELYE H ; Textbook of Endocrinology. [1950. Acta Endocrinologica. Inc. 8) COLE H.H. & P.T. CUPPS, Reproduction in Domestic Animals. I: 77, 1959. Academic Press, N.Y. 9) COLLIP J.B., H. SELYE & J. E. WILLIAMSON, *Endocrinol.* **23**, 279, 1938. 10) SEVERINGHANS A. E. & K. W. THOMPSON, *Proc. Soc. exper. Biol. & Med.* **40**, 627, 1937. 11) FINERTY J. C., H. S. KUPPERMAN & R. K. MEYER, *ibid.* **44**, 551, 1940. 12) MEYER R.K., H.S. KUPPERMAN & J.C. FINERTY ; *Endocrinol.* **30**, 662, 1942. 13) FINERTY J. C., R. K. MEYER & H. N. MARVIN *Anat. Rec.* **90**, 179, 1944. 14) 安田(泰), 保坂(安) 本誌 **6**, 113, 1961. 15) PALLASKE G. & E. SCHMIDEL Pathologische-Histologische Technik. Paul Parey Berlin. 1959. 16) GOLDBERG R.C. & I.L. Chaikoff *Endocrinol.* **36**, 91, 1950.

Summary

Antigonadotrophin formation was produced by the repeated injection of 5 i. u. per days with pregnant mare's serum gonadotrophin and chorionic gonadotrophin into immature female mice.

These antigonadotrophin were recognized after thirty days in the tests of P.M.S.G. injection groups, and after sixty days in the C.G. injection groups.

This antigonadotrophic activity seems to be augmentative as these substances were injected continuously.

Upon the ninety days examination, it was unchanged upon the ovarian weights between injected groups and controls.

It is hard to explain how antigonadotrophin formation cause the increasing of basophiles percentages in hypophysis, however, upon this experiment the increases of these cell were demonstrable in the most cases.