—研究ノート—

卵巣摘出ラットを用いた Hexestrol dicaprylate の発情誘起試験

小野浩臣・重盛正彦*・若藤靖匡*・上松嘉男*・今道友則**

(武田薬品工業株式会社畜産事業部・*動物繁殖研究所・**日本獣医畜産大学)

Hexestrol dicaprylate (以下エステル of 有機酸基の炭素数を表し H_8 と略す) は、持続性の合成 estrogen として知られ、その下垂体性腺刺激ホルモン分泌抑制効果¹⁻³⁾を利用して、雄犬の繁殖力抑制に使用する可能性が認められており^{4,5)}その発情作用について、1945 年に SOLMSEN⁶⁾ の総説がある。

著者らは H_8 の発情作用について、卵巣摘出ラットを用いて検討したが、腔垢反応が不明瞭、不斉かつ遅効性であるために、従来の判定法では他の estrogen のように正確な成績が得られないので、Allen-Doisy 変法⁷⁾に準拠し腔垢判定法に変更を加えて、発情誘起量 (ED_{50}) の測定を試みた。

120 日齢体重 195~235 g の成熟 Wistar-Imamichi ラットの卵巣を摘出し、発情休止期が継続することを確認し、術後 21 日から各動物に 1 日 2 回 (投与間隔 8 時間) 2 日間、鼠蹊部から H_8 (1.5~8 μ g/0.1 ml ギョ油) を皮下注射した (注射総量 6~32 μ g)。試験期間中、投与動物を個別に飼育し、 H_8 投与開始後朝夕 2 回腔垢を検査した。

著者らは腔垢像を 5 段階法によって判定した⁸⁾。すなわち、I 期 (発情前期)、有核上皮細胞と粘液顆粒; II 期 (真の発情期)、角化上皮細胞散在し粘液顆粒が多い; III 期 (腔垢の発情期)、角化上皮細胞集塊状; IV 期 (発情後期)、原形質の明るい大型円形有核上皮細胞と白血球; V 期 (発情休止期)、IV 期像に近いものもあるが白血球が溶解し、一般に細胞成分が少ない; の 5 段階である。

H_8 投与による卵巣摘出ラットの腔垢反応は、比較的

不斉であった。その腔垢像では、V 期から I 期への移行像 (V_{-I})、角化上皮細胞に白血球を混ざるもの (III_{-IV})、V 期像のようにみられるが角化上皮細胞を比較的多く含むもの (V_{-II}) 等がみられた。また、反応出現状況では、常用されている判定時期、すなわち注射終了 48 時間 (注射開始後 96 時間) に達しても反応が現れず、翌日 III 期像を呈して V 期に移行するものや、大量投与群の中にも注射後 84~96 時間に至ってはじめて発情像を呈するものがあるなど判定時期を特定できにくい成績であった。

従って、本実験において、著者らは前述の移行型を含めて腔垢を判定し、判定時期についても 48 時間に固執せず、注射終了後から 4 日間 (96 時間) の腔垢検査結果を 24 時間毎に整理し、陽性反応の発現の割合を次の如く狭義及び広義の場合に分けて表 1 に示した。

すなわち、1) [I~III] は発情前期像及び発情期像を明らかに呈する狭義の場合、2) [V_{-I} ~III] は発情休止期から発情前期への移行型 (V_{-I}) 及び発情休止期から発情期への移行型 (V_{-II}) をも含めて (I~III) と合せて発情像と判定した広義の場合である。

注射終了 24 時間後では大量投与群でも発情反応はみられないが、14 μ g 群では 9 例中 2 例に V_{-I} がみられた。48 時間後では 16 μ g 群の陽性反応が 90% に達し、高投与群より却ってよい成績となっている。72 時間後には 16 μ g 群は陽性率が 100% に達するが、最高量投与群では約 80% に止まった。さらに、96 時間後では全般的に反応陽性率が上昇するが、20 μ g 以上の高投与群では、前日陽性を示したものが V 期に移行してしまうものも少数みられるため、陽性率は 100% に達していない。しかし投与終了 96 時間後に至る全経過中に、1 回でも陽性を示した個体を集計すると、I~III 期を示す反応は不斉であるが、 V_{-I} ~III 期の分類では明瞭な用量反応関係がみられた。

これらの成績から、腔垢反応が典型的な発情像あるいは発情前期像を示さないが、 V_{-I} あるいは V_{-II} という

Estrus-inducing activity of hexestrol dicaprylate by subcutaneous injection in ovariectomized rats.

ONO, Hiroomi, Masahiko SHIGEMORI*, Yasumasa WAKAFUJI*, Yoshio AGEMATSU* & Tomonori IMAMICHI** (Animal Health Products Division, Takeda Chemical Industries, LTD. Tokyo 103; *Institute for Animal Reproduction; **Nippon Veterinary and Zootechnical College)

Japan. J. Anim. Reprod., 26 (2), 1980.

表 1 Hexestrol dicaprylate (H₈) の発情誘起量決定試験成績 (1 日 2 回, 2 日間皮下注射)

投与総量 (μ g)	投与終了後経過時間と反応陽性率									
	24 時間		48 時間		72 時間		96 時間		*全経過中	
	I~III**	V _{-I} ~III***	I~III	V _{-I} ~III	I~III	V _{-I} ~III	I~III	V _{-I} ~III	I~III	V _{-I} ~III
6	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
8	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	2/10	1/10	2/10	1/10	2/10
10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
12	0/11	0/11	0/11	0/11	1/11	4/11	2/11	8/11	2/11	8/11
14	0/9	2/9	3/9	4/9	4/9	5/9	6/9	6/9	6/9	6/9
16	0/10	0/10	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
20	0/10	0/10	0/10	2/10	5/10	7/10	4/10	7/10	5/10	10/10
24	0/11	0/11	1/11	2/11	5/11	7/11	5/11	9/11	5/11	11/11
32	0/11	0/11	6/11	7/11	9/11	9/11	9/11	10/11	10/11	11/11

(注) *: 投与終了後 96 時間に至る全経過中に陽性を示した個体を集計したもの,

**: 発情前期から発情期までを含む,

***: 発情休止期から発情前期への移行型 (V-I) から発情期までを I~III に加えたもの。

表 2 発情誘起試験における Hexestrol dicaprylate (H₈) 投与終了後 10 日目の卵巢摘出成熟ラットの子宮, 副腎, 下垂体の重量

区 分 (ラット数)	体 重	子宮重量	副腎重量	下垂体重量
6 μ g (3 匹)	304.0 g	126.0 mg	66.0 mg	13.2 mg
	298.0	133.0	61.2	12.0
	290.0	130.1	54.2	12.8
	Av.	129.70	60.47	12.67
10 μ g (3 匹)	302.0	110.5	71.5	12.2
	338.0	154.0	70.9	14.9
	317.0	214.0	79.9	15.4
	Av.	159.50	74.10	14.17
14 μ g (3 匹)	329.0	140.0	68.9	13.9
	322.0	210.0	61.7	15.8
	352.0	188.0	53.7	12.7
	Av.	179.33	61.43	14.13
卵巢摘出 対照 (3 匹)	333.0	72.0	45.6	11.4
	343.0	84.0	51.2	11.6
	327.0	93.0	62.6	12.0
	Av.	83.00	53.13	11.67

と終了後 48 時間における ED₅₀ は, 直線性を無視して算出すると, 23.8 μ g (95% F. L. E. 17.1~33.0 μ g) となり極めて変動幅が大きいが, 96 時間までの反応陽性総和の ED₅₀ は 11.2 μ g (95% F. L. E. 11.1~11.3 μ g) であり, H₈ の発情誘起作用は, estradiol の 0.1 μ g, hexestrol の約 0.3 μ g (今道: 未発表) と比べて極めて弱いと判断された。

なお, H₈ は残留性が強く, 14 μ g 群のように投与終了 48 時間では反応陽性率が 50% に満たなかった低用量でも, 投与終了 96 時間以降においても, さらに 1~2 日発情の続くものもみられた。また, 14 μ g 以下の低投与量群について, 6, 10, 14 μ g 群からそれぞれ 3 匹を抽出して投与終了 10 日後剖検し, 子宮, 副腎, 下垂体の重量を測定したところ, 表 2 に示すように, 卵巢摘出対照群 (試験群と同一日に手術し 33 日経過) と比較していずれの臓器も重く, 特に子宮重量では顕著な差がみられた。H₈ の発情作用が弱い反面, その遅効性と関連して残留性が強いことは, 鶏を用いた残留試験からも認められている⁹⁾。従って, 一般に estrogen の assay では, 試験終了後の動物を反復使用して差支えないことになっているが¹⁰⁾, H₈ のような遅効性で残留性のある合成 estrogen の bioassay においては, 卵巢摘出動物を反復使用してはならないことが判明した。

(1980. 2. 23 受付)

文 献

- 1) 小野 (浩)・山下 (和): 日畜会報, 44, 417, 1973.

移行型を示すものも反応陽性に加え, H₈ 投与終了後 48 時間の反応と, 96 時間までに反応陽性を示した個体を集計した反応とについて ED₅₀ を算出して比較した。投

- 2) ONO, H. & K. YAMASHITA: 日獣誌, **36**, 245, 1974,
- 3) ONO, H., T. MIURA, J. MIZOGUCHI & T. IMAMICHI: 日獣誌, **39**, 437, 1977.
- 4) 梶原 (純)・三船 (亮)・吉田 (市)・吉田 (龍)・辻 (文)・山田 (一)・田中 (正)・伊藤 (誠): 日獣会誌, **26**, 234, 1973.
- 5) 三木 (博)・山田 (法)・秋山 (陽)・野本 (敏)・金山 (保)・山本 (力)・高島 (利)・和田 (信)・並木 (武)・小野 (浩)・武石 (昌)・常包 (正): 東獣畜会誌, (24), 29, 1977.
- 6) SOLMSEN, U. V.: *Chemical Review*, **37**, 481, 1945.
- 7) ホルモン検査法: 東大沖中内分泌同好会誌, 医歯薬出版, 東京, p. 34, 1954 (E. H. VENNING Ed., *Assay of Hormonal Secretions*, In: J. H. COMROE, Jr. Ed., *Methods in Medical Research* Vol. 2., The Year Book Publishers, Inc., Chicago, 1953.)
- 8) 信永 (利)・中村 (勝): 家畜繁殖誌, **14**, 1, 1968.
- 9) 小野 (浩)・仲間 (一)・遠山 (紀)・今道 (友): 日獣大研究報告, **28**, 36, 1979.
- 10) KAHNT L. C. & E. A. DOISY: *Endocrinology*, **12**, 760, 1928.