種々の量の PMSG と hCG を投与後交配した成熟ラットの の卵胞数と血清中のステロイドホルモンの動態

石橋 功・佐藤邦忠*・大沢 満

(山口大学農学部 *帯広畜産大学)

高単位の PMSG を投与した未成熟ラットにおける着床困難の原因は、残存卵胞から分泌される過剰なエストロゲン (E)¹⁻⁴⁾、或いは E とプロゲステロン (P) との不均衡に由来する⁵⁾と推測されている。そしてそれは PMSG に対する抗血清の投与によって採卵率が向上しても⁴⁾、着床は完全に改善できないほどの子宮環境の変化であるとされている^{5,6)}。高橋ら^{7,8)}は PMSG と hCG 50 IU を投与した成熟ラットの妊娠初期に、大型の胞状卵胞が多いこと、および血清中の P 濃度が高いことから、ホルモンの不均衡が着床阻害の原因であろうと推測しているが、E 濃度の測定を欠いている。また上記の未成熟ラット²⁾および成熟ラット^{7,8)}の卵胞の動態についての報告は、組織学的観察によるものではない。石橋⁹⁾は種々の量の PMSG と hCG を投与した成熟ラットの受精と初期発育は、ほぼ順調に行われるが、高単位の投与で hCG 投与後 72 時間 (h) 以降卵子下降が促進されることを明らかにした。本研究は成熟ラットの着床困難が、未成熟ラット同様の原因でおこるか否かを明らかにするために、組織学的方法によって、卵胞の動態について観察すると共に、血清中の P および E 濃度についても検討した。

材料と方法

1. 動物とホルモン処置

当教室で繁殖している体重 200~295 g の Wistar-Imamichi 系ラットを使用した。調節した照明条件下 (07:00~21:00 h 点灯) に飼育して、腔垢像 IV 期 (休止期第 1 日) の 11:00 h に、PMSG (セロトロピン、帝国臓器製薬製) 10, 20, 又は 40 IU を内股部筋肉内に投与

Number of follicles and serum levels of steroid hormone in adult rats which mated following treatment with various doses of PMSG and hCG.

ISHIBASHI, Isao, Kunitada SATO* & Mitsuru OHSAWA (Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753, *Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080)

Japan. J. Anim. Reprod., 30 (4), 1984.

した。54 h 後に当る腔垢像 I 期 (発情前期) の日の 17:00 h に、同量の hCG (ゴナトロピン、帝国臓器製薬製) を同様に投与し、雄と同居させた。翌朝腔垢像を観察し、精子の有無により交配を確認した。動物は hCG 投与後 12 h (暗黒開始後 8 h に当る発情期の 05:00 h) を交配時刻とし、hCG 投与時 (交配前 12 h, ホルモン測定の場合のみ) および hCG 投与後 24 (交配後 12), 48 (36), 72 (60), 96 (84), 120 (108) h に、組織学的観察の場合は頭部打撲法によって殺し、投与量と時間別に 5 頭、計 100 頭の左右卵巢を使用した。ホルモン測定には採血によって殺し各 8 頭、計 192 頭を使用した。

2. 組織学的観察

卵巢はラウドスキー氏液によって固定し、パラフィン包埋後 15~20 μ m の連続切片とし、ハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色を行なった。卵胞は核の存在する部位において、直径 [(長径+短径)/2] 250 μ m 以上のものについて、50 μ m 毎に区分し、以前に記した判定基準¹⁰⁾により、正常卵胞と閉鎖卵胞にわけて観察した。各 50 μ m 毎の区分による検討を行なった結果、合併して表示しても差支えないと認められたので、表 1 のように示した。

3. 採 血

採血はエーテル麻酔下で腹部大動脈から行なった。血液は 4°C の冷蔵庫内に半日程度保存した後、3,000 rpm (750 G) で冷却遠心して血清を分離し、測定まで -20°C で保存した。

4. ステロイドホルモンの測定

ホルモンの測定は牧野の方法¹¹⁾に従い、ラジオイムノアッセイ法により、³H 標識ステロイドホルモンを用いて行なった。標準曲線は 0~500 pg/tube の間で直線に近くなるように抗血清を希釈し、測定に必要な血清量は予め予備試験で求め、20 pg/tube 以下とならないようにした。³H 標識ステロイドホルモンの結合型と遊離型の分離には、50% 硫酸アンモニウム液を用いた。使用した抗血清は帝国臓器株式会社製のものであり、progesterone-3-oxime-BSA, estrone-17-oxime-BSA および es-

Table 1. Number of follicles (Mean $\pm$ se) in adult rats which mated following treatment with various doses of PMSG and HCG (per 5 rats=10 ovaries)

Time ¹⁾ of Ob.	Doses (iu)	Number of follicles of various sizes in diameter (μ m) ²⁾									
		Healthy					Atretic				Grand
		250-	300-	400-	500-	Total	250-	400-	500-	Total	Total
24 (12)	0	10.8 $\pm$ 1.3	32.4 $\pm$ 3.4	22.8 $\pm$ 3.7	5.2 $\pm$ 1.8	71.2 $\pm$ 6.1	37.0 $\pm$ 5.7	15.8 $\pm$ 1.5	7.8 $\pm$ 1.3	60.6 $\pm$ 6.6	131.8 $\pm$ 12.3
	10	5.2 $\pm$ 1.1	30.0 $\pm$ 7.6	26.2 $\pm$ 6.3	12.6* $\pm$ 2.6	74.0 $\pm$ 12.9	22.0 $\pm$ 8.9	18.2 $\pm$ 7.0	11.0 $\pm$ 2.9	51.0 $\pm$ 18.2	125.2 $\pm$ 28.6
	20	11.8 $\pm$ 2.7	40.2 $\pm$ 6.9	22.4 $\pm$ 3.7	16.2 $\pm$ 3.2	90.6 $\pm$ 14.9	31.8 $\pm$ 7.2	19.6 $\pm$ 4.7	15.8* $\pm$ 3.1	67.2 $\pm$ 14.3	157.8 $\pm$ 25.6
	40	14.0 $\pm$ 1.7	33.0 $\pm$ 6.9	23.2 $\pm$ 3.8	27.6** $\pm$ 4.6	97.8* $\pm$ 8.6	21.4 $\pm$ 5.9	13.2 $\pm$ 2.6	11.4 $\pm$ 1.7	46.0 $\pm$ 8.3	143.8 $\pm$ 14.9
48 (36)	0	12.0 $\pm$ 3.1	18.8 $\pm$ 5.3	13.2+ $\pm$ 1.7	8.0 $\pm$ 1.1	52.0 $\pm$ 10.4	40.4 $\pm$ 10.6	18.2 $\pm$ 4.3	7.4 $\pm$ 1.1	66.0 $\pm$ 14.1	118.0 $\pm$ 24.3
	10	12.2 $\pm$ 2.4	29.6 $\pm$ 6.5	14.8 $\pm$ 3.2	10.2 $\pm$ 1.6	66.8 $\pm$ 7.3	40.0 $\pm$ 4.6	31.4* $\pm$ 3.1	15.6** $\pm$ 1.2	87.0 $\pm$ 7.5	153.8 $\pm$ 13.7
	20	13.8 $\pm$ 2.8	29.0 $\pm$ 5.2	19.2 $\pm$ 5.6	8.4+ $\pm$ 1.2	70.4 $\pm$ 14.0	52.6 $\pm$ 7.7	30.2 $\pm$ 5.8	10.8 $\pm$ 3.5	93.6 $\pm$ 14.8	164.0 $\pm$ 21.9
	40	8.0 $\pm$ 1.6	16.0+ $\pm$ 2.7	10.4+ $\pm$ 2.2	21.6** $\pm$ 3.3	56.0++ $\pm$ 4.2	20.0 $\pm$ 3.0	19.2 $\pm$ 3.8	9.2 $\pm$ 1.1	48.4 $\pm$ 5.2	104.4+ $\pm$ 7.7
72 (60)	0	8.0 $\pm$ 1.4	12.4+ $\pm$ 1.6	8.2++ $\pm$ 1.4	12.6+ $\pm$ 1.0	41.2++ $\pm$ 3.7	26.4 $\pm$ 7.5	10.8 $\pm$ 3.0	5.6 $\pm$ 0.8	42.8 $\pm$ 9.6	84.0 $\pm$ 12.3
	10	10.2 $\pm$ 1.2	23.4** $\pm$ 2.6	10.4+ $\pm$ 1.4	7.6 $\pm$ 0.5	51.6 $\pm$ 2.9	54.4* $\pm$ 7.9	34.8* $\pm$ 5.9	14.0 $\pm$ 3.6	103.2+,* $\pm$ 9.1	154.8** $\pm$ 11.7
	20	13.6 $\pm$ 2.5	22.2 $\pm$ 4.8	11.0 $\pm$ 4.6	9.2 $\pm$ 1.6	56.0 $\pm$ 11.9	55.6 $\pm$ 14.0	22.0 $\pm$ 4.7	12.2** $\pm$ 1.0	89.8* $\pm$ 17.0	145.8* $\pm$ 20.3
	40	11.6 $\pm$ 2.7	14.2+ $\pm$ 2.4	8.2++ $\pm$ 3.2	12.4+ $\pm$ 5.0	46.4++ $\pm$ 9.8	38.0 $\pm$ 8.9	16.0 $\pm$ 2.3	6.8 $\pm$ 2.8	60.8 $\pm$ 10.0	107.2 $\pm$ 3.2
96 (84)	0	7.0 $\pm$ 1.4	12.6+ $\pm$ 3.7	7.2++ $\pm$ 3.6	13.6+ $\pm$ 2.5	40.4 $\pm$ 6.4+	27.4 $\pm$ 3.1	8.0 $\pm$ 1.8	8.0 $\pm$ 1.4	43.4 $\pm$ 3.8	83.8 $\pm$ 10.0
	10	8.2 $\pm$ 4.8	13.6 $\pm$ 4.1	5.4++ $\pm$ 1.4	10.0 $\pm$ 0.6	37.2 $\pm$ 10.1	30.8 $\pm$ 10.6	13.4* $\pm$ 0.9	8.8 $\pm$ 1.8	53.0 $\pm$ 12.0	90.2 $\pm$ 21.8
	20	9.6 $\pm$ 2.2	16.4+ $\pm$ 3.0	4.4++ $\pm$ 1.4	11.4 $\pm$ 1.1	41.8+ $\pm$ 6.0	35.0 $\pm$ 5.7	15.8* $\pm$ 2.6	8.4 $\pm$ 2.0	59.2 $\pm$ 7.9	101.0 $\pm$ 11.7
	40	6.6+ $\pm$ 1.0	7.6++ $\pm$ 2.1	2.4++ $\pm$ 0.3	12.2+ $\pm$ 1.2	28.8++ $\pm$ 4.1	17.6 $\pm$ 4.4	5.8 $\pm$ 2.0	4.8 $\pm$ 1.1	28.2 $\pm$ 6.8	57.0++ $\pm$ 8.3
120 (108)	0	5.6 $\pm$ 1.1	11.8+ $\pm$ 3.0	4.0++ $\pm$ 0.8	10.6 $\pm$ 1.9	32.0++ $\pm$ 6.0	24.8 $\pm$ 5.9	6.0 $\pm$ 1.8	14.0++ $\pm$ 1.1	44.8 $\pm$ 7.3	76.8 $\pm$ 13.0
	10	8.4 $\pm$ 2.6	18.6 $\pm$ 2.7	7.4++ $\pm$ 2.1	7.6 $\pm$ 1.4	42.0 $\pm$ 8.5	28.2 $\pm$ 5.8	9.8 $\pm$ 3.8	11.4 $\pm$ 1.4	49.4 $\pm$ 9.9	91.4 $\pm$ 17.9
	20	9.6 $\pm$ 2.5	19.8+ $\pm$ 2.9	10.4 $\pm$ 3.4	5.8++,* $\pm$ 0.7	45.6 $\pm$ 5.2	27.4 $\pm$ 1.1	8.4 $\pm$ 3.9	9.4 $\pm$ 1.4	45.2 $\pm$ 6.4	90.8 $\pm$ 11.3
	40	4.0++ $\pm$ 0.6	10.4++ $\pm$ 2.4	7.4++ $\pm$ 2.5	8.6++ $\pm$ 2.1	30.4++ $\pm$ 6.8	23.4 $\pm$ 2.0	3.6 $\pm$ 1.1	10.6 $\pm$ 2.4	37.6 $\pm$ 3.1	68.0+ $\pm$ 9.5

¹⁾ Hours after hCG injection (or after the estimated time of mating). hCG was injected 4 h before the beginning of darkness on the day of prooesterus (or 54 h after PMSG injection).

²⁾ *, ** Significantly different from untraeted rats at the same time (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

+, ++ Significaftly different from 24 h after hCG injection in the same treated group (+ $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$).

tradiol-6-BSA を抗原として作製したものである。Sephadex LH-20 カラム・クロマトグラフィーによる estrone (E_1), estradiol- 17β (E_2) の溶出分画は 1.6~2.4, 2.8~4.2 ml であり、回収率は 83 (75~90), 72 (65~80) % であった。 E_1 と E_2 の water blank に (盲検値, 各 10 例の平均 $\pm$ 標準誤差) は 1.7 ± 0.5 , 7.0 ± 0.3 pg であり, Sephadex LH-20 カラム・クロマトグラフィーによる精製を行なわなかった P の回収率は 90 (75~100%), water blank は 7.6 ± 1.1 pg であった。各ステロイドホルモン測定値の within-assay の変動係数は, 50 pg と 500 pg で P: 10.3 と 4.0%, E_1 : 7.9 と 3.4%, E_2 : 10.0 と 4.8% であり, 血清を用いての between-assay の変動係数は P: 8.6%, E_1 : 7.8%, E_2 : 7.6% であった。

5. 成績の処理

成績の処理は分散分析および *t*-検定によった。

結 果

1. 組織学的観察

組織学的観察による黄体数は, 個体および hCG 投与後の時間別に若干の変動があったが, 平均すると無処置, 10, 20, 40 IU 投与群の黄体数 ($\pm$ 標準誤差, $n=25$) は 13.6 ± 0.4 , 18.3 ± 0.9 , 31.9 ± 1.8 , 48.2 ± 2.0 個であった。またホルモン投与群の黄体の大きさは, 多くの場合無処置に比較して小さく, 組織がやや疎で, 黄体の形成が不完全のように観察され, この傾向は投与量の増加に伴って増すように見受けられた。

卵胞数の推移は表 1 に示した。hCG 投与後 24 (交配後 12) h における 10, 20, 40 IU 投与群の正常卵胞総数は, 74.0, 90.6 および 97.8 個 (無処置の 71.2 個に対し $P<0.05$) であるが, 以後時間の経過に伴って減少し, 96 (84) h では 37.2, 41.8, 28.8 個であった。大きさ別にこれを見ると, 無処置およびホルモン投与群の 499 μ m 以下の正常卵胞数は, 時間の経過に伴って減少し, hCG 投与後 96~120 (交配後 84~108) h では, 多くの場合 24 (12) h の卵胞数に対し, 有意 ($P<0.05$ または 0.01) な減少を示した。500 μ m 以上の正常卵胞数は, 無処置とホルモン投与群とで推移を異にし, 無処置では交配後 12 h の 5.2 個から 60~84 h の 12.6~13.6 個へ増加した ($P<0.05$)。これに対し, 10, 20, 40 IU 投与群の hCG 投与後 24 (交配後 12) h では 12.6, 16.2, 27.6 個で無処置に比較して有意 ($P<0.05$ または 0.01) に多いが, 以後減少して, 48 (36) h では 40 IU 投与群のみが多く ($P<0.01$), 72 (60) h 以後はいずれも無処置と差がなかった。

閉鎖卵胞総数は無処置では交配後 60 h 以降少ない傾向を示したが, 有意な減少ではなかった。ホルモン投与群では hCG 投与後 48~72 (交配後 36~60) h まで増加する傾向を示した後, 減少した。そしてこの傾向は低単位投与群の小型の卵胞 (<499 μ m) において顕著であった。

2. 血清中のステロイドホルモン濃度

無処置の P 値は交配後 12 h の 15.3 ± 1.1 ng/ml から, 交配後 108 h の 58.9 ± 6.2 ng/ml へ直線的に増加した (図 1)。10, 20, 40 IU 投与群の hCG 投与時 (交配前 12 h) の P 値は, 19.2 ± 1.9 , 20.8 ± 1.5 , 21.3 ± 1.8 ng/ml であり, 20 および 40 IU 投与群では無処置より有意 ($P<0.05$) に高かった。以後 10 および 20 IU 投与群では直線的に増加し, hCG 投与後 96 (84) で 98.3 ± 12.2 , 113.3 ± 12.5 ng/ml に達し, 120 (108) h でもほぼこの水準が維持された。しかし 40 IU 投与群では急激に上昇して hCG 投与後 72 (60) h に 170.3 ± 11.5 ng/ml のピークに達するが, 以後急激に減少して 120 (108) h には 70.9 ± 8.2 ng/ml となった。ホルモン投与群の交配後の P 値は, 40 IU 投与群の 120 (108) h の場合を除き, いずれも無処置より有意 ($P<0.01$) に高かった。

E 値の推移は図 2 に示した。無処置の E_1 値は $14.3\pm$

1). *, **, +, ++ See the legends of Table 1.

Fig. 1. Serum progesterone concentration (Mean $\pm$ SE) in adult rats which copulated following treatment with various doses of PMSG and hCG.

1), *, **, +, ++ See the legends of Table 1.

Fig. 2. Serum estrone and estradiol-17 β concentrations (Mean $\pm$ SE) in adult rats which copulated following treatment with various doses of PMSG and hCG.

2.9 $\pm$ 21.8 $\pm$ 2.0 pg/ml の範囲にあり、大きい変動はなかった。ホルモン投与群では、10 IU 投与の hCG 投与後 96 $\sim$ 120 h、および 20 IU 投与の 24 h に無処置より高い値 ($P < 0.05$) を示した以外は、いずれも差がなかった。

10, 20, 40 IU 投与群の hCG 投与時 (-12 h) の E₂ 値は 62.0 $\pm$ 8.7, 61.6 $\pm$ 7.7, 98.8 $\pm$ 9.2 pg/ml で、いずれも無処置より高いが ($P < 0.05$ または 0.01), hCG 投与後 24 (12) h では無処置 (9.3 $\pm$ 2.2 pg/ml) と差のない値まで低下した。以後 10 および 20 IU 投与群では大きい変化がないが、40 IU 投与群では 72 (60) h に無処置より高い値 (27.5 $\pm$ 3.0 pg/ml, $P < 0.01$) を示した後、減少した。

考 察

MILLER & ARMSTRONG²⁾ は PMSG 4 IU を投与した、未成熟ラットの妊娠 1 日 (精子発見日) $\sim$ 5 日の大卵胞数は 1 以下であり、高橋ら^{7,8)} も無処置成熟ラットの大型

胞状卵胞数が 0 であったと報じている。本実験の無処置では、500 μ m 以上の正常卵胞数は交配後の時間の経過に伴って増加し、60 h 以降自然排卵数に匹敵する数にまで増加した。妊娠初期に hCG または LH の投与により、誘起排卵が可能であることから¹³⁻¹⁵⁾、この時期に相当数の大卵胞が存在することは明らかである。またこの推移は性周期における 500 μ m 以上の卵胞数および誘起排卵数の推移¹⁶⁾と類似し、かつ妊娠初期の誘起排卵数の推移¹⁴⁾とも似ていることから、発情前期 $\sim$ 発情期の FSH サージ¹⁷⁻¹⁹⁾によって発育したものであろうと考えられる。

PMSG 40 IU を与投した未成熟ラットの大卵胞数 (non-luteinized follicle を含む) は、妊娠 1 日の 27.5 個から 5 日の 12.3 個へ減少し、PMSG と hCG 50 IU 投与の成熟ラット^{7,8)}では 3.7 $\sim$ 6.3 個である。本実験の 40 IU 投与群の 500 μ m 以上の正常卵胞数は、PMSG と hCG 50 IU 投与の成熟ラットの場合^{7,8)}より明らかに多く、未成熟ラットの傾向と一致した。しかしながら、本実験では hCG 投与後 72 h 以降、無処置と差がない数にまで減少している点で未成熟ラットの場合²⁾と相違している。このことは LH の投与が E 受容体数を減少させ、卵胞の閉鎖と黄体化を促進することから²⁰⁾、hCG 併用投与の影響と考えられる。低単位ホルモンの投与群の小型の卵胞に閉鎖が多い傾向を示した本実験の結果と同様の傾向は、未成熟マウスでもみられる²¹⁾。閉鎖卵胞の増加が、卵管や子宮のホルモン環境に影響を与えるか否かについては明らかでない。しかしながら、OSTEEN & MILLS²²⁾ は家兎で小型の卵胞の P と E₂ 含量は少なく、かつ E₂ が低く P 値の高いものは、初期の閉鎖卵胞であろうと推測していることから、閉鎖卵胞の E 値への影響は少ないと考えられる。

本実験における P 値は、PMSG 4 IU 投与の未成熟ラット^{2,4)}および成熟ラットの場合⁷⁾同様の推移を示した。PMSG 40 IU 投与の未成熟ラット^{2,4)}では、妊娠 3 日に 190 $\sim$ 200 ng/ml の値を示し、5 日にもその値が維持されるが、PMSG と hCG 50 IU 投与の成熟ラット⁷⁾では、妊娠 5 日に 180 ng/ml 程度の高値を示して減少する。本実験の 40 IU 投与群では、hCG 投与後 72 (交配後 60) h にピークに達するが、その後急激に減少して居り、上記の報告^{2,4,7)}とはピークの時期と推移でやや様相を異にする。またこの結果は、hCG 投与後 96 または 120 h まで増加する 10 および 20 IU 投与群の成績とも相違する。交配後卵巣割去したラットでは、P の投与または埋込みによって胚が維持され^{26,27)}、PMSG 30 IU 投与後

多数の着床が得られるハムスター²⁸⁾では、無処置の 4～5 倍に達した P 値が維持されることを併せ考えると、本実験における 40 IU 投与群の結果は、胚の維持困難を示すものといえよう。そしてその原因は、不完全な黄体の早期退化によるのではないかと推測される。なお家兎では交配後の P 処置が卵子下降を促進し²⁹⁾、過排卵処置した家兎では P の関与が推測されている³⁰⁾。本実験の 40 IU 投与群の P 値のピークの時期は卵子下降促進の時期⁹⁾と一致しているが、P が関与するか否かについては明らかでない。

本実験の無処置および 10, 20 IU 投与群の E_2 値は、交配後大きい変化がなく、PMSG 4 IU 投与の未成熟ラット^{2,4)}および無処置成熟ラットにおける E_2 の動態と一致した傾向を示した。ラットでは妊娠 3 日の遅い時期^{31,32)}または 4 日^{33~35)}に E_2 の上昇が認められ、最初の胚が子宮に到達する 4～5 h 前に卵管における E_2 受容体数の増加が始まること、および E_2 受容体と血中 E_2 の上昇とは時期が一致することが報告³⁵⁾されている。さらにラットの妊娠 1 日の E_2 投与は 11 h 後から卵子下降を促進する³⁶⁾ほか、卵子下降に E の関与が指摘されている^{37~39)}。また家兎でも卵管組織における高い E_2 取り込みが、子宮への卵子移動に必要である⁴⁰⁾。

本実験の 40 IU 投与群における交配後の E_2 値は低く、PMSG 40 IU 投与の未成熟ラット^{2,4)}の妊娠 2 日に 156～201 pg/ml に達し、以後漸減する結果とは推移を異にし、むしろ 4 IU 投与の場合と似ている。この相違は恐らく hCG 投与の有無によると考えられる。すなわち、未成熟ラットの PMSG 単一投与では、排卵が長時間にわたること^{2,4,41)}、および成熟ラットでは上述のように大型の正常卵胞が急激に減少することから推測できる。なお、PMSG 30 IU を投与したハムスターでは、妊娠 6 日までの E_2 値は低いこと²⁸⁾が報告されている。高単位の PMSG を投与した未成熟ラットの着床阻害は、多数の残存卵胞から分泌される過剰な E_1 ^{1~4)}、あるいは E と P の不均衡によると報告⁵⁾されている。本実験の 40 IU 投与群における hCG 投与後 72 (交配後 60) h の E_2 値の有意に高い結果は、卵子下降の促進に E_2 の関与を強く示唆しているが、この時期における大型正常卵胞数は無処置と差がなく、この結果からは説明出来ない。しかしながら、hCG 投与後 72 (交配後 60) h では 50% 以上の胚が子宮から採卵される事実⁹⁾、および胚の子宮到達より E_2 の上昇が僅かに先行するという指摘³⁵⁾、さらに本実験は 24 h 間隔の観察であることを併せ考えるとき、この時期以前の大型正常卵胞の影響を受けて、

hCG 投与後 72 h より僅かに早い時期から E_2 が上昇している可能性が推測される。

以上の本実験の結果から、高単位の PMSG と hCG を投与した成熟ラットの着床困難は、卵管および子宮におけるホルモン環境の異常に起因していると考えられる。そしてそれは、hCG 投与後 72 (交配後 60) h における E_2 の増加による卵子下降の促進と、この時期以後における P の減少による胚の維持困難に由来している可能性が考えられる。

要 約

高単位の PMSG と hCG を投与した成熟ラットの着床困難の原因を検討するため、卵胞の動態を組織学的に観察すると共に、P, E_1 , E_2 値をラジオイムノアッセイ法により測定した。

1. 無処置ラットの 500 μ m 以上の正常卵胞数は、交配後 12 h の 5.2 個から 60～84 h の 12.6～13.6 個へ増加した。

2. PMSG と hCG 投与群の 500 μ m 以上の正常卵胞数は、hCG 投与後 24 (交配後 12) h では無処置に比較して有意に多く ($P < 0.05$ または 0.01), 48 (36) h では 40 IU 投与群のみが多かった ($P < 0.01$)。

3. 低単位のホルモン投与群の小型 (<499 μ m) の閉鎖卵胞は、hCG 投与後 48～72 (交配後 36～60) h まで増加する傾向を示した後減少した。

4. P 値は時間の経過に伴って増加し、無処置では交配後 108 h に 58.9 ng/ml, 10, 20 IU 投与群では hCG 投与後 96 (84) h に 98.3 および 113.3 ng/ml に達し、120 (108) h でもほぼその値が維持された。40 IU 投与群では 72 (60) h に 170.3 ng/ml のピークに達した後、急激に減少した。

5. E_1 値は無処置とホルモン投与群の間、および経時的に大きい差違が認められなかった。無処置およびホルモン投与群の E_2 値は、hCG 投与時 (–12 h) に高い値を示したが、24 h 後には減少した。以後無処置と 10 および 20 IU 投与群では大きい変動はなかったが、40 IU 投与群では hCG 投与後 72 (60) h に無処置より有意に高かった ($P < 0.01$)。

以上の結果から、高単位の PMSG と hCG を投与した成熟ラットの着床困難は、卵管および子宮におけるホルモン環境の異常に起因していると考えられる。そしてそれは hCG 投与後 72 (交配後 60) h における E_2 の増加による卵子下降の促進と、この時期以後における P の減少による胚の維持困難に由来している可能性が考えら

れる。

本研究は昭和 55~57 年度文部省科学研究費 (総合 A-536021) の補助を受けて行なった研究の一部である。

(1984. 2. 13 受付)

文 献

- 1) MILLER BG & DT ARMSTRONG: *Biol. Reprod.*, **25**, 253, 1981.
- 2) MILLER BG & DT ARMSTRONG: *Biol. Reprod.*, **25**, 261, 1981.
- 3) MILLER BG & DT ARMSTRONG: *Biol. Reprod.*, **26**, 861, 1982.
- 4) WALTON EA & DT ARMSTRONG: *Biol. Reprod.*, **25**, 272, 1981.
- 5) WALTON EA & DT ARMSTRONG: *Biol. Reprod.*, **27**, 841, 1982.
- 6) WALTON EA, S HUNTLEY, TG KENNEDY & ET ARMSTRONG: *Biol. Reprod.*, **27**, 847, 1982.
- 7) 高橋 (寿)・本田 (和)・正木 (淳): 本誌, **28**, 59, 1982.
- 8) 高橋 (寿)・本郷 (裕)・正木 (淳): 日畜会報, **53**, 260, 1982.
- 9) 石橋 (功): 本誌, **29**, 1, 1983.
- 10) 利部 (聡)・石橋 (功): 本誌, **28**, 1, 1982.
- 11) 牧野 (拓): 日内分泌誌, **49**, 629, 1983.
- 12) GREENWALD GS: *Endocrinology*, **79**, 572, 1966.
- 13) BROWN-GRANE K: *J. Endocr.*, **43**, 529, 1969.
- 14) TAYA K & S SASAMOTO: *J. Reprod. Fert.*, **51**, 467, 1977.
- 15) TAKAHASHI, M, K SHIOTA & Y SUZUKI: *Biol. Reprod.*, **21**, 813, 1979.
- 16) 石橋 (功)・利部 (聡)・黒鳥 (英): 本誌, **25**, 31, 1979.
- 17) HIRSHFIELD AN & AR MIDGLEY: *Biol. Reprod.*, **19**, 597, 1978.
- 18) HIRSHFIELD AN & AR MIDGLEY: *Biol. Reprod.*, **19**, 606, 1978.
- 19) HOAK DC & NB SCHWARTZ: *Proc. Acad. Sci. USA.*, **77**, 4953, 1980.
- 20) RICHARD JS: *Endocrinology*, **97**, 1174, 1975.
- 21) 今井 (倭)・笹本 (修)・鈴木 (俊): 本誌, **10**, 114, 1965.
- 22) OSTEEN KG & TM MILLS: *Biol. Reprod.*, **22**, 1040, 1980.
- 23) WIEST WG: *Endocrinology*, **87**, 43, 1970.
- 24) MORISHIGE WK, GJ PEPE & I ROTCHCHILD: *Endocrinology*, **92**, 1527, 1973.
- 25) TAYA K & GS GREENWALD: *Biol. Reprod.*, **25**, 683, 1981.
- 26) FORCELLEDO ML, P MORALES, R VERA, S. QUIJADA & HB CROXATTO: *Biol. Reprod.*, **27**, 1033, 1982.
- 27) MACDONALD GJ: *Biol. Reprod.*, **27**, 261, 1982.
- 28) GREENWALD GS: *J. Reprod. Fert.*, **48**, 313, 1981.
- 29) GREENWALD GS: *Fert. Steril.*, **12**, 80, 1961.
- 30) TSUTSUMI Y, T TAKEDA & H SUZUKI: *Japan J. Anim. Reprod.*, **26**, 15, 1980.
- 31) WATSON J, FB ANDERSON, M ALAM, JE O'GCAD & PJ HEALD: *Endocrinology*, **65**, 7, 1975.
- 32) BETTIE CW, A CARBIN, G COLE, S CORRY, RG JONES, K KOCH & J TRAY: *Biol. Reprod.*, **16**, 322, 1977.
- 33) YOSHINAGA, K, RA HAWKINS & JF STOCKER: *Endocrinology*, **85**, 103, 1969.
- 34) SHAIK AA: *Biol. Reprod.*, **5**, 297, 1971.
- 35) FUENTEALBA B, R VERA, M. NIETO & HB CROXATTO: *Biol. Reprod.*, **27**, 12, 1982.
- 36) ORIEZ M-E, M VILLALON & HB CROXATTO: *Biol. Reprod.*, **21**, 1163, 1979.
- 37) GREENWALD GS: *Endocrinology*, **69**, 1068, 1961.
- 38) BARNEGEE BN: *J. Reprod. Fert.*, **17**, 157, 1968.
- 39) 信永 (利): 本誌, **14**, 77, 1968.
- 40) EL-BANNA AA & B SACHER: *Biol. Reprod.*, **17**, 1, 1977.
- 41) WALTON EA, G EVAND & DT ARMSTRONG: *J. Reprod. Fert.*, **67**, 91, 1983.

Summary

Present study was carried out to determine the factors causing poor implantation rates in adult rats treated with high doses of PMSG and hCG. Two hundred ninety two rats were housed under artificial lighting (light from 07:00 to 21:00 h), and injected with 10, 20, or 40 IU of PMSG at 11:00 h on the day of early diestrus. Then the females were injected with the same dose of hCG 54 h later (corresponding to the time of LH surge of normal proestrus), and mated with a male overnight. Both ovaries were removed from 24 to 120 h after hCG injection (or 12 to 108 h after mating) at 24 h intervals, and were sectioned. Healthy and atretic follicles larger than $250\ \mu\text{m}$ in diameter were classified in each sizes of $50\ \mu\text{m}$. For radioimmunoassay of progesterone, estrone and estradiol- 17β , blood was collected from the abdominal aorta at the time of hCG injection and various times after hCG.

1) In untreated rats, the number of healthy follicles larger than $500\ \mu\text{m}$ in diameter increased with time after mating. In 40 IU-treated rats at 24 and 48 h after hCG injection, the number of healthy follicles of this sizes was significantly more than that of untreated rats ($P<0.01$). 2) The serum concentration of progesterone in untreated, 10 and 20 IU-treated rats increased gradually until 96 or 120 h after hCG injection, whereas in 40 IU-treated rats, progesterone level reached a peak at 72 h after hCG injection, then decreased rapidly to control level by 120 h. 3) At the time of hCG injection, estradiol- 17β value was high in all groups, and decreased rapidly 24 h later. The low levels were maintained in untreated and 10 IU-treated groups until 120 h after hCG injection. But in 40 IU-treated rats, estradiol- 17β level was significantly higher than that of untreated rats at 72 h after hCG injection ($P<0.01$).

These results suggest that the low rates of implantation in adult rats treated with high doses of PMSG and hCG may be due to the abnormal hormonal environment in the oviducts and uterus. It may result from the high level of estradiol- 17β at 72 h after hCG injection and dramatic decrease in the concentration of progesterone from 96 to 120 h.