Effects of Gonadotropin Administration and Transplantation of the Pituitary Gland on Incidence of Implantation in Immature Rats

Isao ISHIBASHI, Tetsuro ABE, Yuichiro NISHIFUJI
and Tetsuyuki SUGA

*Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture,
Yamaguchi University, Yamaguchi 753*

(Accepted for publication November 30, 1987)

Summary. This investigation was carried out to examine the effect of treatment with PMSG alone or combined PMSG and hCG by the dose dependent manner on incidence of implantation in immature rats. Also superfecundity was explored by the transplantation of the pituitary gland under the kidney capsule.

In the present study, incidence of pregnancy decreased from 73.3 (80–90) % in rats treated with 10 IU of PMSG (or PMSG and hCG) to 6.7 (6.7–13.3) % of 40 IU-treated ones. The number of implantation sites per pregnant (per mated) rat treated with PMSG alone also decreased from 12.2 (10.4) to 9.0 (0.6) in a dose dependent manner. Administration of 20 IU of hCG in combination with the same dose of PMSG affected on the number of implantation sites per mated rat. Prolactin injection (5–15 IU/day) during 1 to 7 days of pregnancy in rats treated with 20 IU of GTH had no effect on improvement of implantation. In contrast, when immature rats induced to superovulate by transplantation of the pituitary gland under the kidney capsule, higher pregnancy rates (80–90%) and the number of implantation sites (19.3–20.4/pregnant rat; 16.3–17.3/mated rat) were obtained.

From these results, it is suggested that the cause of diminished implantation in immature rats treated with high doses of GTH may be due to the loss of embryos from the uterus by accelerated transport, however, further studies are need to verify this presumption. **KEY WORDS:** IMMATURE RAT, GTH, PITUITARY TRANSPLANTATION, IMPLANTATION.

Jpn J Anim Reprod 34, 26–30, 1988

種々の量の性腺刺激ホルモンの投与又は 下垂体を移植した未成熟ラットの着床

石橋 功・安部 哲朗・西藤 裕一郎・菅 徹行
山口大学農学部, 753 山口市吉田 1677-1

性腺刺激ホルモン (GTH) を投与した未成熟 (Cole, 1937; Evans and Simpson, 1940; Wu and Meyer, 1966; Miller and Armstrong 1981-a, b) 及び成熟ラット (Cole, 1937; 石橋ら, 1970; 高橋ら, 1982; Ishibashi and Furukawa, 1986) の着床についての報告は, 高単位

の投与で着床が困難なことを指摘している。未成熟ラットの着床についての検討は, 従来 PMSG 単一投与の方法によって行なわれて居り, かつ投与量との関連における検討も充分ではない。一方, 成熟ラットでは PMSG 単一投与による過排卵の誘起は困難であり (Welschen

and Rutte, 1971; 石橋・青木, 1976), 雄と一晚同居交配することにより改善されるが, その効果は充分ではない (Ishibashi and Uchinuno, 1984)。従って PMSG に対し, IU 表示で 1/2 量相当以上の hCG の併用が望ましい (石橋・青木, 1976)。

PMSG 40 IU を投与した未成熟ラットの着床の改善について, プロジェステロン (P), エストロジェン (E), 或いは PMSG 抗血清の処置は無効である (Miller and Armstrong, 1982; Walton and Armstrong, 1982)。成熟ラットではプロラクチンの投与が効果があり (Ishibashi and Frukawa, 1986), 下垂体移植 (鮫島・江藤, 1980) や下垂体抽出物の投与 (高橋ら, 1987) によっても高い妊娠率と着床数が得られる。

本研究は, 未成熟ラットに種々の量の PMSG 又は PMSG と hCG を投与して, 投与量と着床の関係を比較検討すると共に, 成熟ラットの着床の改善に有効なプロラクチンの投与及び下垂体移植の影響についても検討した。

材料と方法

供試した動物は Wistar-Imamichi 系ラットを当教室で累代繁殖したものであり, 調節した照明条件下 (午前 7 時からの 14 時間を明るくする) で飼育した。生後 30~33 日齢 (出生日を 0 日とする; PMSG 投与又は下垂体移植時の体重 85~105 g) の 522 頭を使用した。そのほか, 下垂体移植の対照群として成熟雌 (2.5~3.5 カ月齢, 体重 205~270 g) 50 頭, 及び下垂体の提供には成熟と生後 36~42 日齢の雄各 50 頭を用いた。

処置

ホルモン処置は生後 30~33 日の 11:00~13:00 時 (h) に, 5, 10, 20 又は 40 IU の PMSG を内股部筋肉内に投与し, hCG を併用投与するときは, 52~54 h 後 (生後 32~35 日の 17:00 h) に 0~20 IU を投与した。hCG 投与後又はそれに相当する時刻から雄と同居させ, 翌日膣垢像を検査して, 精子の存在により交配を確認した (妊娠 0 日)。

日量 5~15 IU のプロラクチンの投与は, PMSG 20 IU と hCG 0~20 IU を処置した未成熟ラットの妊娠 1~7 日に内股部筋肉内に行った。未成熟ラットへの下垂体の移植は, PMSG 投与と同一日齢同時刻に, 成熟ラットでは膣垢像 IV 期の日の同時刻に, エーテル麻酔で腎皮膜下へ行った。52~54 h 後に当る 17:00 h (LH 放出時: Taya et al, 1983) から雄と同居させた。

観 察

妊娠 8 日に頭部打撲法によって殺し, 着床数を数えた。移植下垂体の状態は屠殺時に点検した。

成績の処理

結果の統計処理は χ^2 及び t 検定によった。

結 果

種々の量の GTH を投与した未成熟ラットの妊娠率及び着床数は Table 1 に示した。すなわち, 交配率は 88.7% (330/372) であり, 妊娠率は PMSG (又は PMSG・hCG) 5~10 IU 投与の 73.3~76.7 (80~90)% から, 40 IU 投与の 6.7 (6.7~13.3)% へ, いずれも有意に低下した ($p < 0.05 \sim 0.001$)。PMSG に対し, IU 表示で 1/2 又は同量の hCG を併用投与した場合の妊娠率は, PMSG 単一投与の場合に比較してやや高い傾向を示したが, 有意な差ではなかった。交配ラット当りの着床数は, PMSG 単一及び PMSG・hCG 併用投与群共に, PMSG 量 5 IU と 10 IU の間には差がなかったが, PMSG 20 IU と 40 IU では PMSG 量 5~10 IU 投与に比較して, いずれも有意に低下した ($p < 0.05 \sim 0.001$)。ただし PMSG・hCG 同量投与の 5 IU と 20 IU 投与の間では差を認めなかった。また PMSG 単一投与と PMSG・hCG 併用投与の間では, PMSG 量 20 IU の間で有意な差 ($p < 0.05$) が認められたほかは, いずれも差がなかった。なお, 妊娠ラット当りの着床数は, 各投与量間及び PMSG 単一投与と PMSG・hCG 併用投与間のいずれにおいても, 有意な差が見られなかった。

PMSG 20 IU と hCG 5~20 IU を投与した未成熟ラットの妊娠 1~7 日に, 日量 5~15 IU のプロラクチンの投与は着床を改善しなかった (Table 2)。

成熟又は未成熟雄ラット下垂体を未成熟雌に移植したとき, 成熟ラットの場合同様に, 高い妊娠率 (80~90%) と着床数 (妊娠ラット当り 19.3~20.4 個) が得られた (Table 3)。この結果は, 妊娠率及び着床数共に, PMSG・hCG 20 又は 40 IU 投与の場合に比較して有意に高かった ($p < 0.05 \sim 0.001$)。

考 察

本実験における種々の量の GTH 投与後の交配率は 88.7% (330/372) であり, 成熟ラットの 94.6% (Ishibashi and Frukawa, 1986) に比較して低い。その原因は雌雄の体格差, 性成熟及び性行動などによると推測されるが, 詳細は明らかでない。

Table 1. Incidence of pregnancy and the number of implantation sites in immature rats treated with varying doses of gonadotropins

Doses (IU)		No. of rats used	Incidence of pregnancy (%)	No. of implantation sites		
PMSG	hCG			Per mated rat (M±SE)	Per pregnant rat (M±SE)	Range
5	0	33	23/30 ¹⁾ (76.7) a ²⁾	9.7±1.2 a ³⁾	12.6±1.0	2-25
10	0	33	22/30 (73.7) b	10.4±1.4 b	14.2±1.4	6-27
20	0	33	9/30 (30.0) c	4.5±1.5 c	15.0±3.0	3-28
40	0	33	2/30 (6.7) d	0.6±0.4 d	9.0±2.8	7, 11
5	5	37	24/30 (80.0) e	9.2±1.2 e	11.6±1.0	4-26
10	5	33	24/30 (80.0) f	12.1±1.5 f	15.1±1.3	3-28
	10	34	27/30 (90.0) g	12.7±1.4 g	13.8±1.3	2-29
20	10	35	10/30 (33.3) h	4.2±1.3 h	12.6±2.1	1-21
	20	34	16/30 (53.3) i	8.0±1.7 i	15.0±1.8	4-28
40	20	33	2/30 (6.7) j	1.2±0.9 j	18.5±5.0	15, 22
	40	34	4/30 (13.3) k	1.2±0.6 k	8.8±2.0	5-13

- 1) No. of pregnant rats/No. of mated rats. The percentage of mated rats was 88.7% (330/372, 81.1-93.8%).
- 2) $p < 0.05$: e, f vs i; c vs d. $p < 0.01$: h vs j; i vs g, k, $p < 0.001$: a, b vs c, d; e, f, g vs h, j, k; i vs j.
- 3) $p < 0.05$: c, g vs i. $p < 0.01$: a, b vs c. $p < 0.001$: a, b vs d; e, g, i vs k; f vs h, j.

Table 2. Effect of prolactin injection on incidence of pregnancy and the number of implantation sites in immature mated rats pretreated with 20 IU of PMSG followed by 0 to 20 IU of hCG

Doses (IU)			Incidence of pregnancy (%)	No. of implantation sites		Range
PMSG	hCG	Prolactin		Per mated rat (M±SE)	Per pregnant rat (M±SE)	
	0	5	2/15 (13.3) ¹⁾	2.0±1.7	15.0±14.1	5, 25
		10	4/15 (26.7)	5.9±2.9	22.3±5.1	10-31
20	10	10	7/15 (46.7)	6.3±2.4	13.4±3.5	1-25
		5	3/15 (20.0)	5.3±3.0	26.3±5.5	20-35
	20	10	6/15 (40.0)	5.9±2.2	14.7±2.7	11-27
		15	2/15 (13.3)	3.5±2.5	26.0±5.7	22, 30

- 1) See the legend of Table 1.

PMSG 5~10 IU 投与の妊娠率 73.3~76.7%は、諸氏の PMSG 処置 (Cole, 1937; Wu and Meyer, 1966; Miller and Armstrong, 1981-a) 及び FSH 処置 (Evans and Simpson, 1940) の成績とほぼ一致した。本実験における PMSG・hCG 5~10 IU 投与の妊娠率は、PMSG 単一投与のそれに比較してやや高いが有意な差ではなく、20~40 IU 投与でも同様の傾向にあった。また PMSG・hCG 20 IU 投与の交配ラット当りの着床数は、PMSG 単一投与の場合より高かった ($p < 0.05$)。これらの結果は、未成熟ラットにおいても、成熟ラットの場合同様に、雄と一晩同居交配することにより、過排卵の

誘起が改善されるとしても充分ではなく (Ishibashi and Uchinuno, 1984), hCG の併用投与が望ましい (石橋・青木, 1976) ことを示すものであろう。

PMSG 又は PMSG・hCG 5~10 IU 投与の着床数 (妊娠ラット当り 11.6~15.1 個) は、諸氏の PMSG 単一又は FSH 投与の成績 (Cole, 1937; Evans and Simpson, 1940; Wu and Meyer, 1966) より少ないが、Miller and Armstrong (1981-a) の PMSG 単一投与及び成熟ラットの成績 (Cole, 1937; 石橋ら, 1970; Ishibashi and Furukawa, 1986) とほぼ一致した。差違の原因は系統やホルモンに対する感受性、例数の多少などによるのではない

Tbale 3. Incidence of pregnancy and the number of implantation sites in immature rats after transplantation of the pituitary gland under the kidney capsule

Age of recipient	Age of pituitary donor (male)	Incidence of ^{1,2)} pregnancy (%)	No. of implantation sites		Range
			Per mated ²⁾ rat (M±SE)	Per pregnant ²⁾ rat (M±SE)	
Mature	Mature	23/25 (92.0)***	19.4±1.7***	21.1±1.3***	10-31
Mature	Immature (36-42 days)	20/25 (80.0)***	15.0±1.2***	18.8±1.1+	8-26
Immature (30-33 days)	Mature	24/30 (80.0)***	16.3±2.0***	20.4±1.6**	2-35
Immature (30-33 days)	Immature (36-42 days)	27/30 (90.0)***	17.3±1.5***	19.3±1.2**	5-28

1) No. of rats with implantation sites/No. of transplanted rats.

2) No significantly different among 4 groups.

*, **, *** Significantly different at the 5(*), 1(**) or 0.1(***) % level from rats treated with 20 IU of combined PMSG and hCG in Table 1.

++, ** Significantly different at the 1(++) or 0.1(+++) % level from rats treated with 40 IU of combined PMSG and hCG in Table 1.

かと推測される。また PMSG 単一及び PMSG・hCG 併用投与のいずれの場合においても、PMSG 投与量の増加に伴って妊娠率と着床数が低下した。この傾向は、未成熟ラットの PMSG 単一投与 (Cole, 1937; Miller and Armstrong, 198-a) 及び成熟ラットの GTH 処置の場合 (Cole, 1937; Ishibashi and Frukawa, 1986) と一致した。このことは高単位の GTH の投与が異常なホルモン環境を導き (Miller and Armstrong, 1981-b; Walton and Armstrong, 1981; 石橋ら, 1984)、成熟ラットの場合同様に卵子下降を促進した結果 (石橋, 1983) であろうと考えられるが、明確なことは受精と発育過程などの検討を俟って論及することが適当と思推される。

成熟ラットで有効なプロラクチンによる着床の改善 (Ishibashi and Frukawa, 1986) が、未成熟ラットでは見られなかったが、その原因については明らかではない。鮫島・江藤 (1980) は生後 35~41 日齢雄ラットの下垂体前葉を 3/4 又は 1 個、成熟雌ラットの腎皮膜下に移植して、23.4 又は 31.2 個の着床を得ている。本実験の未成熟ラットにおいても、成熟ラット同様に高い妊娠率と着床数が得られたが、彼等の成績と比較すれば着床数がやや少ない。しかし成熟ラットに下垂体抽出物を投与した高橋ら (1987) の成績と一致する。若干の差違は、ラットの系統、個体や例数の差、さらに移植時における下垂体の取扱いを含む技術的な問題など、種々な要因が影響していると推測される。

以上の結果は、GTH の処置が投与量の増加に伴っ

て、未成熟ラットの妊娠率と着床数を低下させることを示す。その主な原因として、成熟ラットの場合同様に、卵子下降の促進によることを推測させるものであるが、詳細については今後の検討を要する。

References

- Cole HH (1937) Superfecundity in rats treated with mare serum gonadotropic hormone. *Amer J Physiol* 119: 704-712.
- Evans HM, Simpson ME (1940) Experimental superfecundity with pituitary gonadotropins. *Endocr* 27: 305-308.
- Ishibashi I, Tanaka H, Takahashi K (1970) Morphological studies on superovulated rats ova, III. early stage of fertilization and implantation in adult rats following gonadotropin treatment. *Japan J Anim Reprod* 16: 14-19 (in Japanese).
- Ishibashi I, Aoki H (1976) Effect of gonadotropins on maturation and ovulation of oocytes in adult rats, I. Effect of various doses on ovulation. *Japan J Anim Reprod* 21: 130-134 (in Japanese).
- Ishibashi I (1983) Number of ovulation, fertilization and early development of ova in adult rats following treatment with various doses of PMSG and hCG. *Japan J Anim Reprod* 29: 1-7 (in Japanese).
- Ishibashi I, Sato K, Ohsawa M (1984) Number of follicles and serum levels of steroid hormone in adult rats which mated following treatment with various doses of PMSG and hCG. *Japan J Anim Reprod* 30: 199-205 (in Japanese).
- Ishibashi I, Uchinuno Y (1984) The stimulating effect

- of copulation in adult rats treated with PMSG alone. *Japan J Anim Reprod* 30: 233-238.
- Ishibashi I, Furukawa T (1986) Incidence of implantation in adult rats treated with gonadotropins and its improvement by exogenous prolactin. *Japan J Anim Reprod* 32: 188-194.
- Miller BG, Armstrong DT (1981-a) Superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. *Biol Reprod* 25: 253-260.
- Miller BG, Armstrong DT (1981-b) Effects of superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol and progesterone levels and early embryonic development in immature rats. *Biol Reprod* 25: 261-271.
- Miller BG, Armstrong DT (1982) Infertility in superovulated immature rats: role of ovarian steroid hypersecretion. *Biol Reprod* 26: 861-868.
- Sameshima H, Etoh T (1980) Superpregnancy induced by a single pituitary gland transplanted beneath the kidney capsule in adult rats. 89th Congr in Japanese Soc Vet Sci Suppl: 37 (in Japanese).
- Takahashi J, Honda K, Masaki J (1982) Disturbance of pregnancy and the serum prolactin and progesterone levels in superovulated adult rats. *Japan J Anim Reprod* 28: 59-66 (in Japanese).
- Takahashi J, Itoh A, Yasuda Y (1987) Induction of superpregnancy by pituitary extract injection in rat. *Jap J Fert Ster* 32: 327-333 (in Japanese).
- Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S (1983) Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fert* 69: 265-270.
- Walton EA, Armstrong DT (1981) Ovarian function and early embryonic development in immature rats given a superovulatory dose of PMSG later neutralized by antiserum. *Biol Reprod* 25: 272-280.
- Walton EA, Armstrong DT (1982) Implantation and later fetal development in immature rats given a superovulatory dose of pregnant mare's serum gonadotropin, later neutralized by antiserum. *Biol Reprod* 27: 841-846.
- Welschen R, Rutte M (1971) Ovulation in adult rats after treatment with pregnant mare serum gonadotropin during oestrus. *Acta Endocr* 68: 41-49.
- Wu J-T, Meyer RK (1966) Delayed implantation in gonadotropin-treated immature rats. *Proc Soc exp Biol Med* 123: 88-91.

要 約

生後30～33日齢の未成熟ラットに、種々の量の PMSG 又は PMSG と hCG を投与して、着床に及ぼす影響を比較検討すると共に、下垂体移植による着床についても調べた。

1) 種々の量の GTH を投与した未成熟ラットの交配率は88.7%であった。2) PMSG・hCG 5～10 IU 投与の妊娠率(80～90%)は PMSG 5～10 IU 投与の場合(73.3～76.7%)に比較してやや高いが、有意な差ではなかった。20及び40 IU 投与においても同様の傾向であり、かつ5～10 IU 投与に比較して有意($p < 0.05 \sim 0.001$)に低下した。3) PMSG 及び PMSG・hCG 5～10 IU 投与の妊娠(交配)ラット当りの着床数は、12.6～14.2(9.7～10.4)及び11.6～15.1(9.2～12.7)個であり、両群間及び投与量間に有意な差はなかった。しかしながら、PMSG 20 IU と PMSG・hCG 20 IU 投与の間には有意な差($p < 0.05$)が見られた。4) PMSG 単一及び PMSG・hCG 併用投与の場合共に、PMSG 投与量の増加に伴って、妊娠率及び着床数が有意($p < 0.05 \sim 0.001$)に低下した。5) 下垂体移植により、高い妊娠率(80～90%)と着床数(妊娠ラット当り19.3～20.4個)が得られた。

以上の結果から、GTH 投与量の増加に伴って、妊娠率と着床数が低下することを知らると共に、その主な原因として卵子下降の促進による胚の子宮内からの消失が推測された。しかしながら、その詳細については今後の検討を要する。