

氏 名 (本籍) くぼ 窪 みち 道 もり 護 お 夫 (大阪府)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 4 6 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 4 6 年 6 月 1 1 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 3 6 年 3 月
帯 広 畜 産 大 学 畜 産 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目 マウスの絨毛性性腺刺激ホルモンに対する生物学的反応ならびにその系統差に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査)
教 授 竹 内 三 郎 教 授 西 田 周 作

教 授 勝 野 正 則

論文内容要旨

動物用絨毛性性腺刺激ホルモン（HCGと略）製剤は家畜の繁殖障害の治療並に生産増強の領域で大いに活用されているが、それらの成果はHCG製剤の品質の良否に支配される。従ってHCG製剤の力価の検定は極めて重要であり、その正しい検定法が要請される。

現在、本邦では動物用HCG製剤の力価検定法として、マウス単位法を用いているが、力価の表示は万国共通の国際単位によるべきで、その検定法の確立が必要である。

HCG製剤の力価検定における生物学的反応に関しては明らかでない点が少なくない。この生物学的反応を解明するにはその作用発現についての基礎的研究、即ち実験動物のHCGに対する反応の特異性、感受性、反応精度、再現性並にこれらに関する遺伝的、生理的及び環境的諸要因についての研究が重要である。

本論文は、ddマウスならびに近交系マウスを用いてHCGに対する生物学的反応について、生理的、遺伝的要因に関して基礎的な研究を行い感受性の高い幼若雌マウスによる生物学的力価検定法を確立することを目的としたものである。

第1章において、動物用HCG製剤使用の現況を調査したところ、HCG製剤は性腺刺激ホルモン製剤の約73%を占めていた。繁殖障害の治療に極めて有効な作用を有していることが認められた。

第2章においては、ddマウスを用いてHCGの生物学的反応を検討し、力価検定法の確立をはかった。

第1節では、HCG 6.0国際単位（IUと略）の皮下注射に対するddマウスの卵巢の出血濾胞、黄体形成反応について、注射時体重別で比較したところ、体重の大小により反応陽性率に差がみられ、8.0～8.5gと9.0gで反応陽性率の高い結果を得た（第1表）。また、各々の注射時体重別における反応陽性率は左、右の卵巢間に有意差は得られなかった。次いで反応陽性率の高かった8.0～9.0g前後のddマウスを用いて用量反応曲線を検討した結果、1.0IU以下では反応陽性率は低く、4.5IU以上では反応曲線は横道いを示し、1.0～4.5IUの用量範囲で漸増する用量反応曲線が得られた（第2表、第3表）。また、HCG 1.5～6.0IU.に対して本反応は反復実験により再現性が確められた。

第2節、HCGに対する卵巢の出血濾胞、黄体形成反応は質的反應であるので、この反應を生物檢定法として定量化するには反應値の數値變換をおこない用量反應曲線の直線性を検討することが必要であるとみられる。そこで、第1節の成績をプロビット法で分析し、HCG用量反應曲線の直線性ならびに冬期と夏期によるHCGに対する反應性について検討した結果、HCG 1.5～6.0IU.に対する卵巢の出血濾胞、黄体形成反應曲線の直線性は否定されなかった。このことは、本反應によって、HCG 1.5～6.0IU.の用量間におけるHCG量を定量的に測定する

ことが可能であることが認められた。次いで、冬期と夏期による反応性の差異について比較したところ、両季節間におけるプロビット回帰直線の間には有意の差はみられなかった。しかし、冬期のプロビット回帰直線は全体的に低く、冬期において反応性の低下する傾向のあることがみられた。

第3節では、HCGに対する質的な卵巣の出血細胞、黄体形成反応に比較して、反応値が定量的に取り扱える卵巣および子宮の重量反応について検討した。まず⁴、卵巣および子宮の新鮮重量とブアン氏液による固定重量について比較した。すなわち、HCGの生物検定において、同時に多数例の材料を扱う場合が多いので方法の簡便化が可能であるか、どうかを検討するために、卵巣および子宮の新鮮重量と固定重量の関係について調べた。その結果、卵巣の新鮮重量と固定重量の相関係数は0.894、子宮の新鮮重量と固定重量の相関係数は0.954で各々の相関係数は $P < 0.001$ で高い有意性を示した。また、卵巣および子宮の新鮮重量ならびに固定重量について回帰直線を求め、回帰係数の有意性を検討したところ、 $P < 0.001$ で有意性を示すことが明らかとなった。これらの結果から、剖検時に多数の新鮮材料の測定が不可能のとき、固定して測ることも1つの方法とみられる。

次に、HCG用量に対する卵巣重量反応について検討した(第1図)。卵巣の新鮮重量および固定重量ともに1.0 I. U.で1つのPeakを示し、1.5 I. U.では1.0 I. U.よりも重量の減少、1.5 I. U.以後ではゆるやかな上昇曲線を示した。また、HCG用量に対する卵巣重量の増加が著明でないことから、dマウスの卵巣重量反応はHCGの生物検定法に適さないことが認められた。

さらに、HCG用量に対する子宮重量反応について検討した。子宮の新鮮重量ならびに固定重量はHCG用量の増加に対して漸増し、0.5~6.0 I. U.の用量範囲において、上昇傾向を示す反応曲線が得られた。各HCG用量に対する子宮の新鮮重量および固定重量の平均値の差の検定においては、1.0 I. U.と1.5 I. U.、4.5 I. U.と6.0 I. U.の関係を除く、他の用量間で、いずれも有意差が得られた。また、HCG 0.5~6.0 I. U.においては回帰直線が成立し、回帰係数は高い有意性を示した。(第2図)。また、反復実験による反応の再現性について検討した結果、再現性のあることが認められた。従って、マウス子宮重量反応はHCGの生物検定法に用いられるものとみられる。

第4節では、HCGに対し、定量的に取り扱えるマウス子宮重量反応が、日常、最も遭遇する要因と考えられる温度、飼料条件の変化に伴って、どのような変動を示すかについて検討した。その結果、低温(7~10℃)、適温(18~21℃)、高温(32~35℃)の各温度条件に対する子宮重量の2次回帰は有意として認められた。このことは、低温、高温に対して、子宮重量反応は減少するとみられる。また、飼料条件に対する子宮重量の回帰は、高い有意性を示すことから、減少を示す直線であると認められた。さらに、温度条件の回帰の分散比に対して、飼料条件の回帰の分

散比は 3.6 倍大きく、飼料条件の影響の大きいことが認められた。以上の結果は、HCG の生物検定において、飼料条件、温度条件の制御が重要であるとみられる。

第 5 節では、HCG に対するマウス子宮重量^も反応、卵巢の出血^も濾胞、黄体形成反応による生物検定において、一定の範囲にある精度の成績を得るために必要なマウス数について検討した。その結果、子宮重量反応では 1 用量、5、10 匹の使用では標準誤差が著るしく大きい、15、20 匹となると、その値は小さくなる。しかし、これ以上、マウス数を増加しても増加したわりには、その値は小さくならなかった。卵巢の出血^も濾胞、黄体形成反応では 1 用量、30 匹を用いると、130 匹の示す反応に近い値を示すことが認められた。また、6 点法、4 点法検定による反復試験の結果、子宮重量反応、卵巢の出血^も濾胞、黄体形成反応は 1 用量、20～30 匹を用いることにより、HCG の生物検定法として用いられることが認められた。

第 6 節では、HCG に対する dd マウスの卵巢の出血^も濾胞、黄体形成反応、子宮重量反応が誘発する相互の関係を明らかにするため、抗絨毛性性腺刺激ホルモン血清（抗 HCG 血清と略）による HCG 作用の遮断実験をおこなった。その結果、HCG 1 回皮下注射による出血^も濾胞、黄体形成反応、子宮重量反応は 48 時間からみられ、96 時間で高い反応値を示したが、144 時間では反応値は低下した。そこで、HCG 1 回皮下注射後、抗 HCG 血清を 10 時間^々隔で 1 回皮下注射し、HCG 注射後、96 時間目に解剖して、反応の発現を観察したところ（第 3 図）、黄体形成反応は 20 時間、出血^も濾胞反応は 30 時間、子宮重量反応は 40 時間からみられた。さらに、抗 HCG 血清を 3 時間^々隔で 1 回皮下注射し、反応の発現をみたところ、黄体形成反応は 15 時間、出血^も濾胞反応は 24 時間からみられた。このことは、HCG に対する卵巢の黄体形成反応は HCG が 15 時間前後、作用することにより発現するものとみられる。また、出血^も濾胞反応は 21 時間まで抑制され、24 時間から発現した。したがって、出血^も濾胞反応の誘起には HCG が 24 時間前後、作用することを要するとみられる。また、子宮重量反応の発現には 40 時間前後、HCG が作用することが必要であると考えられる。

第 7 節では、HCG に対する dd マウスの卵巢の出血^も濾胞、黄体形成反応、卵巢および子宮重量反応について反応精度を比較した。

出血^も濾胞、黄体形成反応並に子宮重量^は反応^は HCG を定量的に測定することが可能であり、また実験反復により再現性のあることが認められた。しかし前者は 1 用量に必要なマウスの最小有効数が後者より幾分多く、一方、後者の場合は前者の 1 次反応に対し 2 次反応であるから検定物中に HCG 以外の子宮重量増加物質の存否を確める必要がある。なお、卵巢重量反応は HCG 投与量と用量反応が平行関係を示さず生物検定法に適さない。

第3章においては、第2章で提起された、HCGに対するddマウスの生物学的反応における変動について、マウスの系統、その成長過程ならびに遺伝的要因に関し、ddマウスと近交系マウスを用いて検討した。

第1節では、HCGに対するddマウスと近交系マウスの生殖器反応の感受性について比較したところ、HCG 1.5 I. U.に対する膣開口反応は各系統マウスとも高い反応陽性率を示したが、出血嚢胞、黄体形成反応の陽性率はマウスの系統によって異なり、AAは感受性が低く、DDK, CF井1, C3H/Hc, NC, C57BL/6は感受性が高いことが認められた(第4図)。また、卵巣重量反応はHCG用量に比較して、マウスの系統による差異が大きかったが、子宮重量反応ではマウスの系統に比較して、HCG用量による差異の大きいことがみられた。さらに、HCG用量に対する系統マウスの子宮重量反応をみると、DDK, RR, NCでの子宮重量の増加は低く、AA, C57BL/6では高い重量の増加を示し、マウスの系統によって、HCGに対する感受性の異なることがみられた。また、HCG用量に対し、1次直線を示し、生物検定に適するとみられる系統マウスとして、AA, C57BL/6, SS, ddが挙げられるが、AAはSS, ddに対して、さらに、反応性の高いことが認められた。また、ddマウスの腹間変動は近交系マウスに比較して大きいことが明らかとなった。

第2節では、成長過程におけるHCGに対する生殖器反応の変化について検討した。

HCGに対する膣開口反応は15日令において、各系統マウスとも高い反応陽性率を示したが、出血嚢胞、黄体形成反応は各系統マウスとも、15日令では反応はみられず、21日令では高い反応陽性率を示し、18日令において、マウス系統間の反応陽性率に差異がみられた(第5図)。したがって、各系統マウスのHCGに対する卵巣の本反応を起す質的变化は18日令前後において発現するものと認められる。

一方、卵巣重量反応は日令間、マウス系統間で異なり、日令による差異はマウス系統間による差異よりも大きい傾向がみられた(第6図)。しかし、子宮重量反応においては、日令差に比較して、マウス系統間による反応性の差異が大きいことがみられた(第7図)。これらのことは、HCGに対する卵巣、子宮重量反応は日令ならびにマウスの系統によって、HCGに対する反応性が変化することを示すものとみられる。さらに、HCG低用量(1.5 I. U.)、高用量(6.0 I. U.)に対する成長過程に伴う生殖器反応の変化については、膣開口反応は1.5 I. U.に対し、12日令において高い反応陽性率を示し、用量の違いによる反応陽性率に差異はみられなかった。しかし、出血嚢胞・黄体形成反応は21日令において、用量の違いによる反応陽性率に差がみられたが、24日令においては、反応陽性率に有意差は得られなかった。このことは、24日令においては、本反応の感受性が高まってくるものとみられる(第8図)。一方、卵巣重量反応は、出血嚢胞、黄体形成

反応の発現する 21 日令から HCG 用量に対する増加量は異なったが、子宮重量反応は、12 日令から用量に対する反応値に差がみられた。このことは、HCG 用量に対する卵巣ホルモンの生産、分泌作用が 12 日令の早期から異なるものと推測される。

第 3 節においては、HCG に対する卵巣および子宮重量反応の遺伝的要因について検討した。すなわち、HCG に対し、卵巣重量は大きい、子宮重量増加量の低い DDK と、卵巣重量は小さい、子宮重量増加量の高い C57BL/6 を用いて交雑実験をおこなった。その結果 (第 4 表)、HCG に対する F₁ の卵巣および子宮重量の平均値は両親の系統の中間に出てくること、F₂ の卵巣および子宮の重量平均値は F₁ の卵巣および子宮の重量平均値に近いこと、戻し交雑において、卵巣重量は DDK へ戻し交雑した場合、C57BL/6 へ戻し交雑した場合よりも大きく、子宮重量は反対に DDK へ戻した場合は C57BL/6 へ戻した場合よりも小さい結果が得られた。また HCG に対する卵巣および子宮重量反応値の変異は連続的であることなどから考えられることは、HCG に対する卵巣および子宮重量反応は明らかに遺伝要因が関与していること、そして、その遺伝は単一の遺伝子作用によって支配されるのではなく、ポリジーンによって支配される加算的遺伝子効果にもとづくものと考えられる。

第2表 各HCG用量に対するadマウスの出血細胞，黄体形成反応陽性率と体重について（冬期）

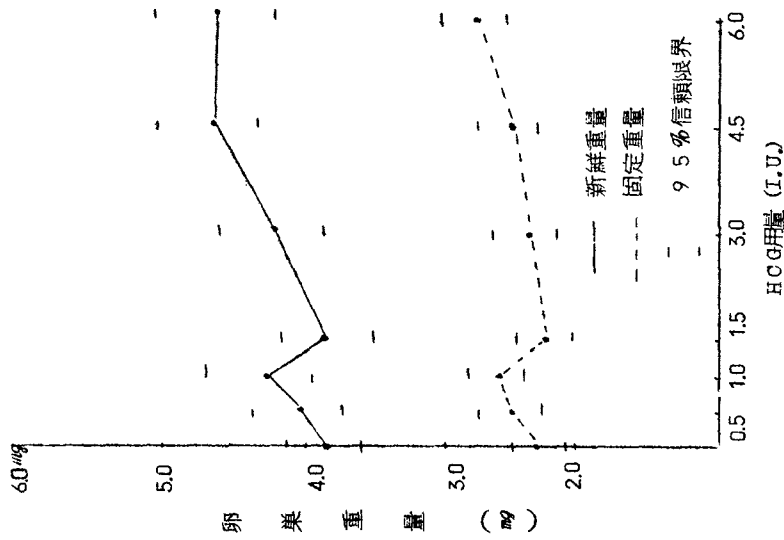
HCG 用量 (I.U.)	マウス数	注射時体重	解剖時体重	出血細胞，黄体形成反応陽性率
0.1	10	8.89 ± 0.67 ⁺	1.231 ± 0.88 ⁺	0/10 0.0%
0.3	10	8.95 ± 0.63	1.259 ± 0.63	0/10 0.0
0.5	81	8.78 ± 0.53	1.204 ± 0.91	2/81 2.5
1.0	122	8.74 ± 0.53	1.157 ± 1.41	9/122 7.4
1.5	139	8.74 ± 0.51	1.178 ± 1.00	40/139 28.8
3.0	131	8.69 ± 0.53	1.192 ± 0.88	81/131 61.8
4.5	126	8.93 ± 0.70	1.188 ± 0.93	102/126 81.0
6.0	81	8.70 ± 0.49	1.179 ± 0.95	72/81 88.9
8.0	10	9.07 ± 0.56	1.210 ± 1.13	9/10 90.0
10.0	10	9.11 ± 0.50	1.231 ± 0.90	10/10 100.0
生理食塩水	98	8.82 ± 0.57	1.187 ± 0.92	0/98 0.0

+ 平均値と標準偏差

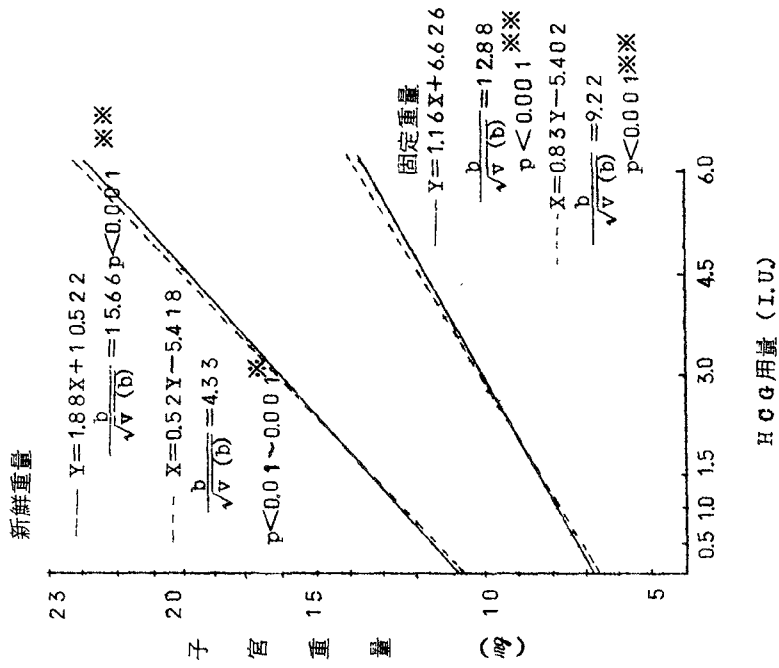
第3表 各HCG用量に対するadマウスの出血濾胞，黄体形成反応陽性率と体重について（夏期）

HCG 用量 (I.U.)	マウス数	注射時体重	解剖時体重	出血濾胞，黄体形成反応陽性率	0.0%
0.1	15	8.91 ± 0.48 ⁺	12.29 ± 0.88 ⁺	0/15	0.0
0.3	15	8.67 ± 0.44	12.13 ± 0.71	0/15	0.0
0.5	131	8.71 ± 0.18	11.38 ± 1.48	3/131	2.3
1.0	134	8.73 ± 0.18	11.58 ± 1.30	23/134	17.2
1.5	132	8.68 ± 0.16	11.49 ± 1.11	38/132	28.8
3.0	131	8.70 ± 0.18	11.46 ± 1.11	89/131	67.9
4.5	127	8.70 ± 0.18	11.70 ± 1.04	106/127	83.5
6.0	132	8.67 ± 0.20	11.60 ± 1.27	118/132	89.4
8.0	15	8.77 ± 0.36	11.94 ± 0.97	14/15	93.3
生理食塩液	135	8.75 ± 0.19	11.45 ± 1.37	0/135	0.0

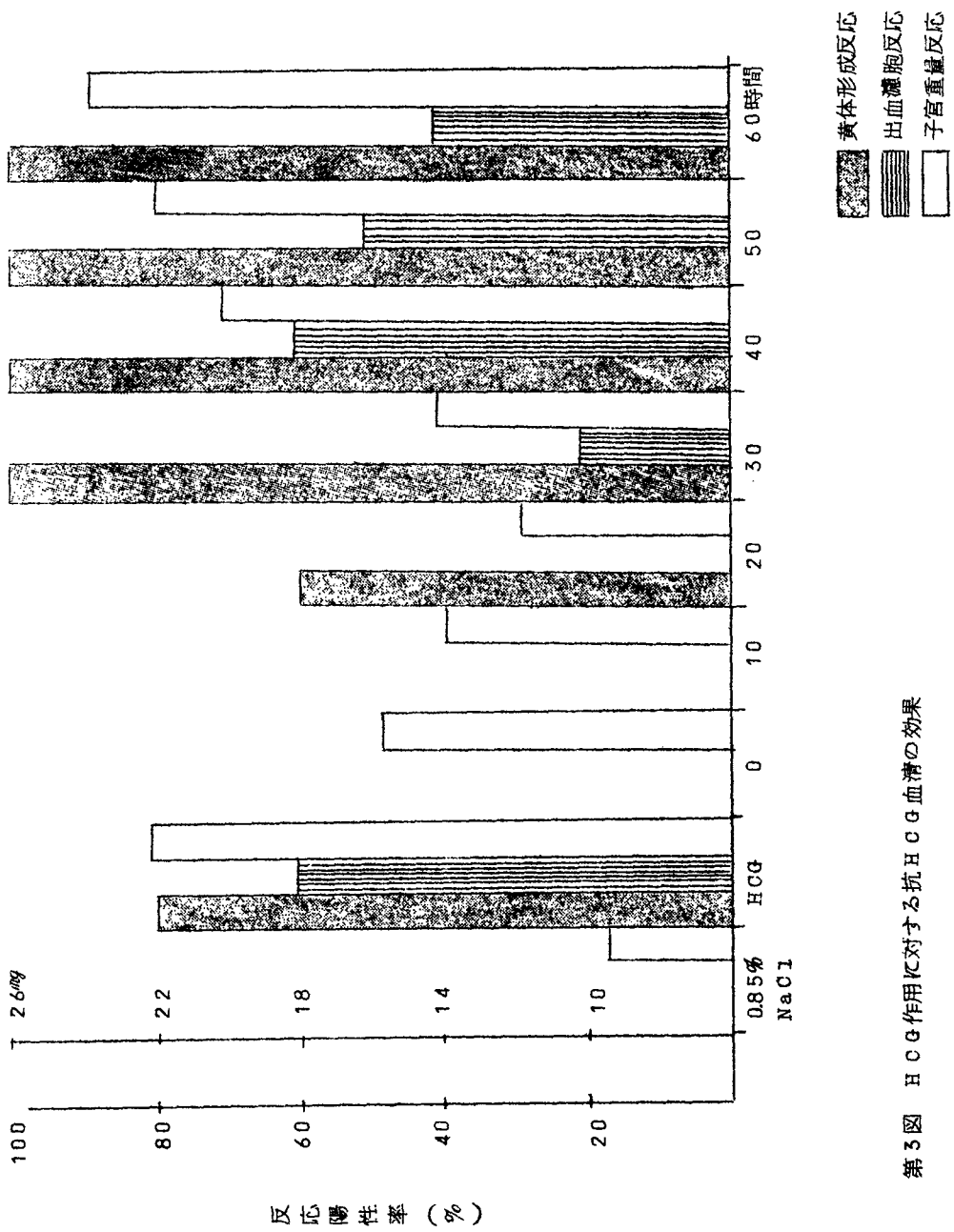
+ 平均値と標準偏差



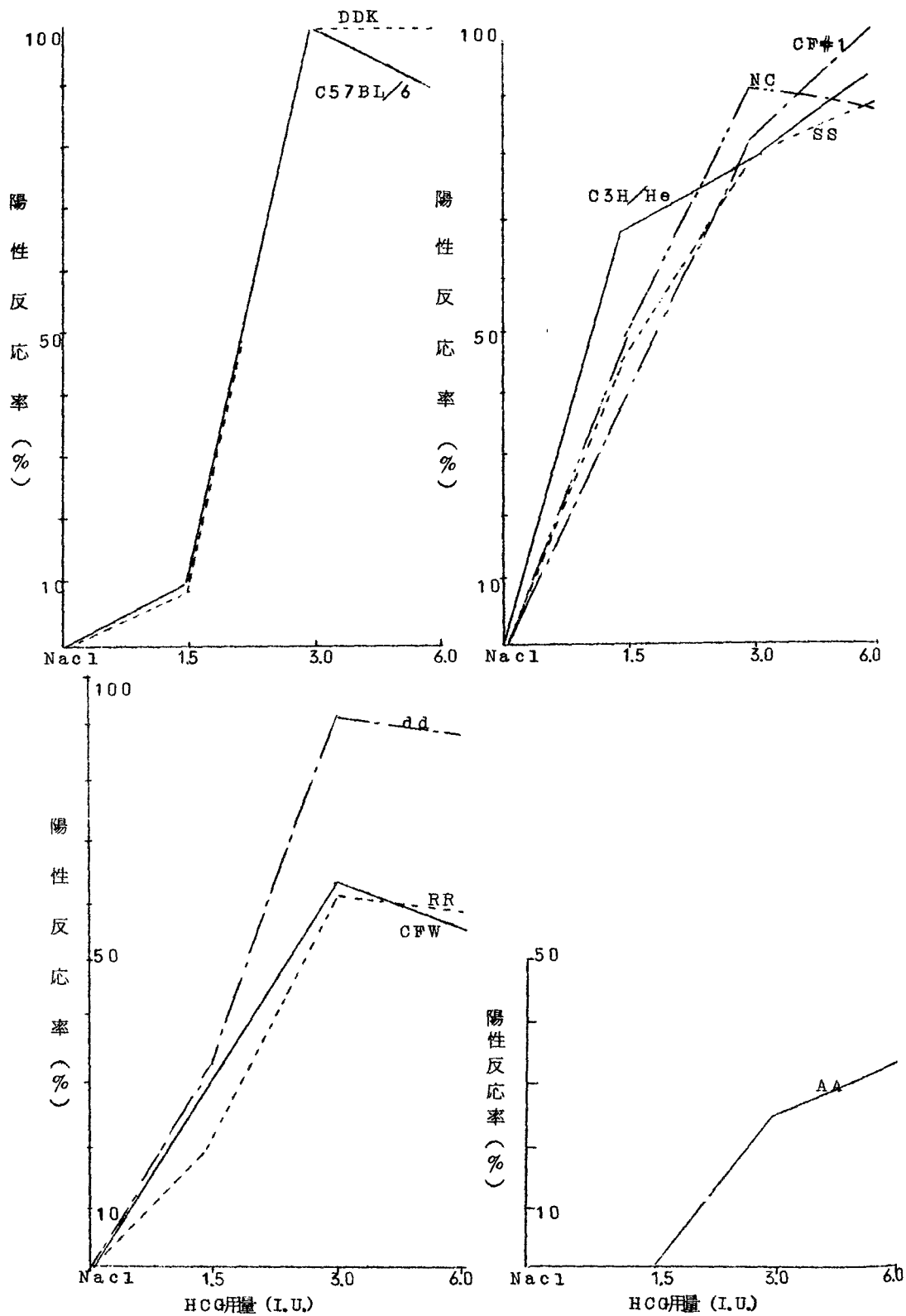
第1図 HCGに対するddマウスの卵巣重量の用量反応曲線



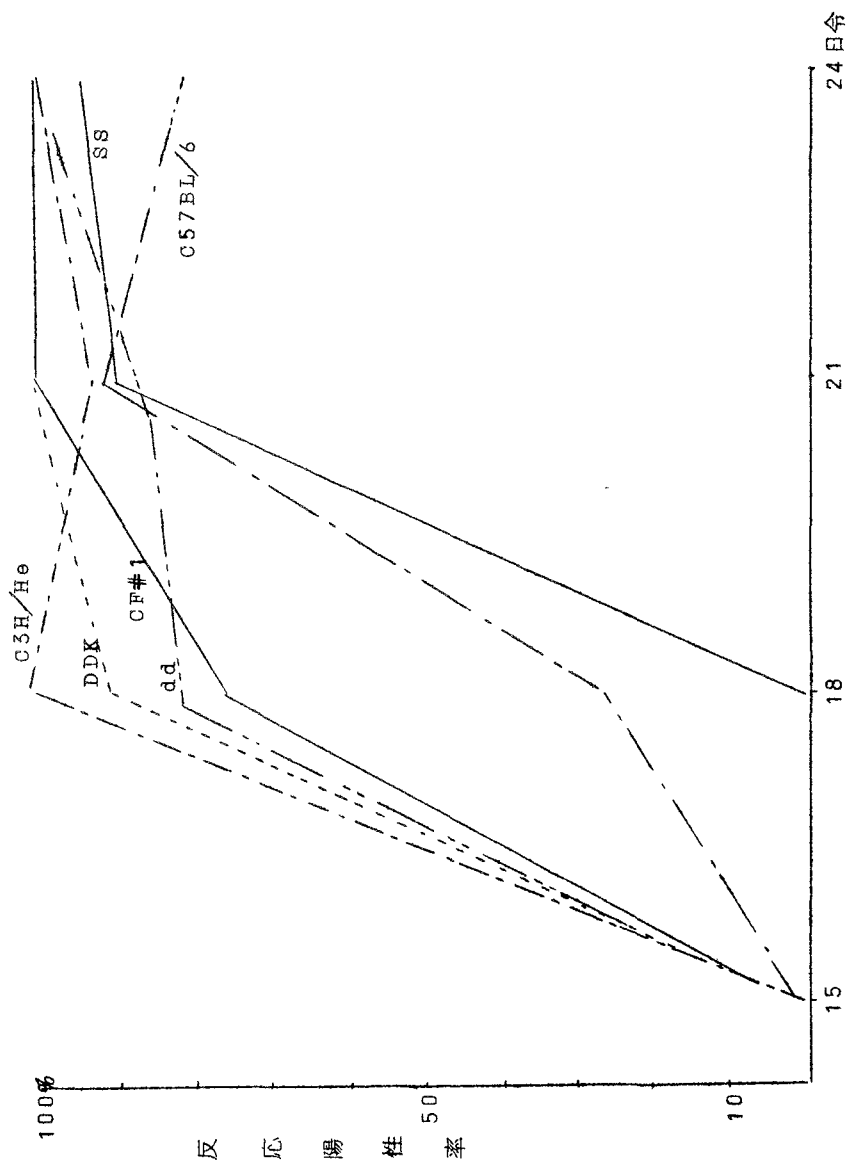
第2図 HCGに対するddマウスの子宮重量反応の用量反応直線



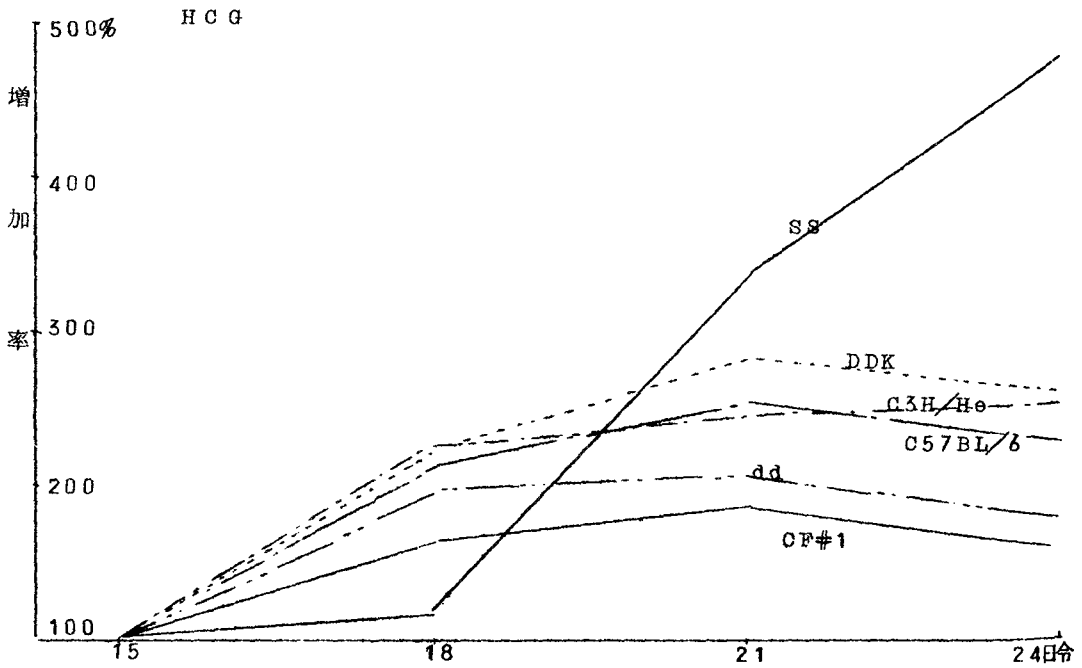
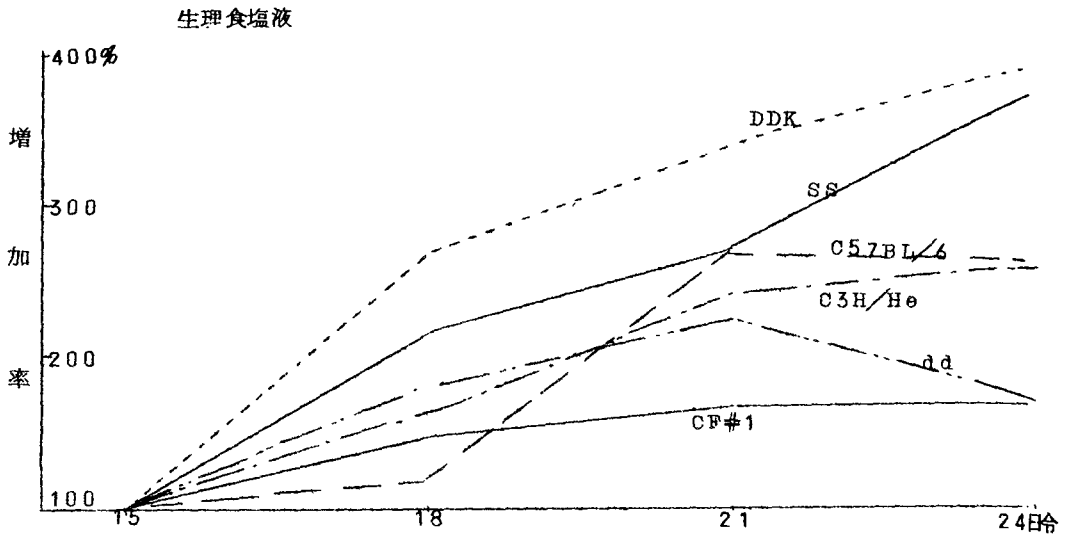
第3図 HCG作用に対する抗HCG血清の効果



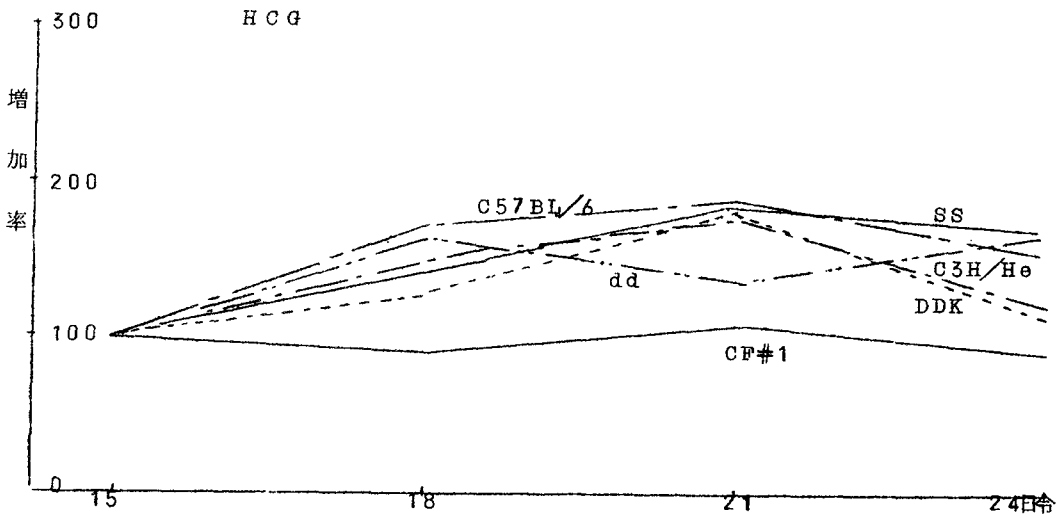
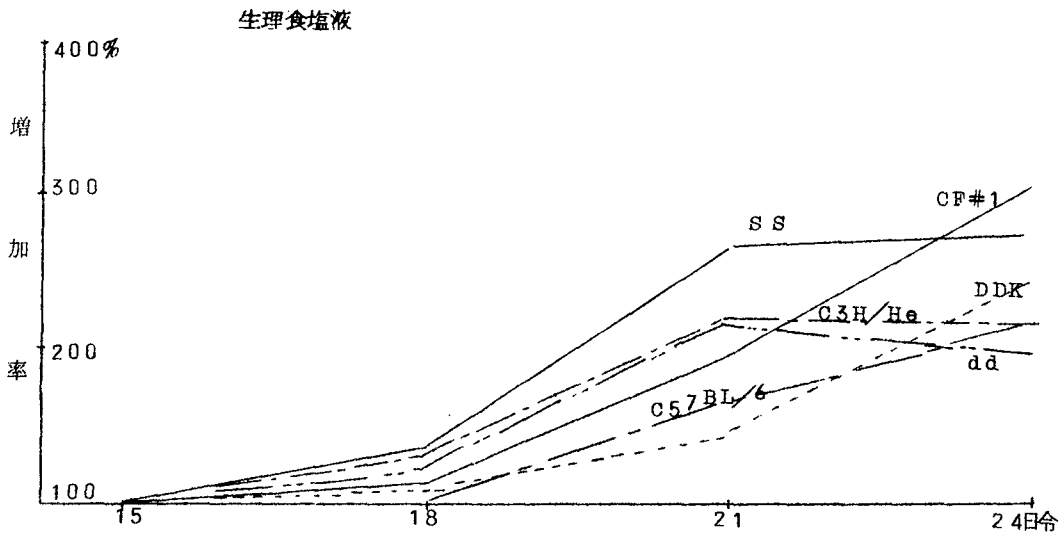
第4図 HCGに対する各系統マウスの出血濾胞，黄体形成反応陽性率



第5図 各系統マウスの日令に伴うHCGに対する出血細胞，黄体形成反応陽性率

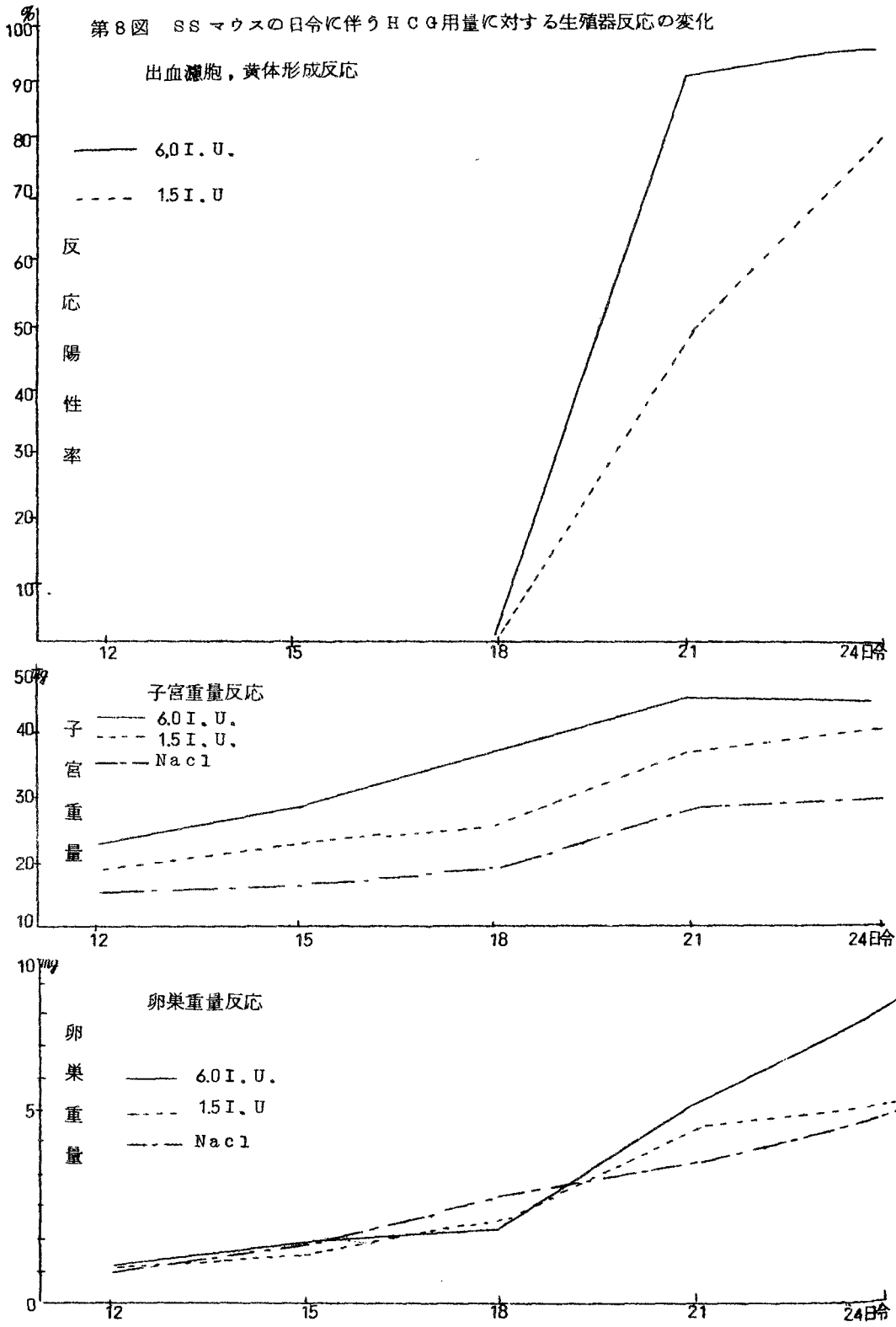


第6図 各系統マウスの日令に伴う生理食塩液ならびにHCGに対する卵巢重量増加率の変化



第7図 各系統マウスの日令に伴う生理食塩液ならびにHCGに対する子宮重量増加率の変化

第8図 SS マウスの日令に伴う HCG 用量に対する生殖器反応の変化



第4表 各マウス区の生理食塩液ならびにHCGに対する体重と生殖器官反応について

各マウス区	用量	マウス数	注射時体重	注射時 腫開口	解剖時体重	解剖時 腫開口	出血細胞, 黄体形成反応	卵巣重量	子宮重量
DDK	NaCl	12	9.64±2.26g	0/12	0% 1.56±1.43g	1/12	8% 0/12	8.45±2.10mg	9.23±2.25mg
	HCG	10	10.05±1.25	0/10	0 12.54±1.51	9/10	90 10/10	10.25±1.78	13.68±2.58
CS7BL/6	NaCl	8	10.45±1.47	0/8	0 12.97±1.20	4/8	50 0/8	3.60±0.71	14.06±4.01
	HCG	11	9.52±2.00	0/11	0 12.71±2.01	11/11	100 11/11	4.73±0.73	39.05±9.43
F ₁	NaCl	13	8.30±1.17	0/13	0 11.23±1.45	0/13	0 0/13	5.04±1.50	10.53±2.50
	HCG	13	8.40±0.88	0/13	0 11.22±0.69	13/13	100 11/13	5.48±1.09	20.69±4.44
P ₂	NaCl	21	9.80±1.08	0/21	0 11.67±1.09	0/21	0 0/21	59.6±2.43	79.5±23.7
	HCG	26	9.71±1.12	0/26	0 13.01±1.14	25/26	96 21/26	6.29±1.27	19.62±5.24
B ₁	NaCl	29	9.70±1.36	0/29	0 11.66±1.47	0/29	0 0/29	65.8±1.33	85.1±3.26
	HCG	21	9.48±1.81	0/21	0 12.26±1.75	21/21	100 18/21	7.01±1.68	19.86±3.60
B ₂	NaCl	14	11.07±1.37	0/14	0 13.16±1.83	0/14	0 0/14	50.3±1.11	89.6±3.55
	HCG	11	9.87±2.14	0/11	0 13.08±1.98	11/11	100 10/11	5.18±1.78	28.83±5.79

平均値 ± 標準偏差

審査結果の要旨

畜産の領域で用いられている動物用ホルモン製剤のうち絨毛性性腺刺激ホルモン（HCGと略）は家畜の繁殖の分野において特に重要な役割を演じているが、それらの成果はHCG製剤の良否に支配される。従ってHCG製剤の力価の正しい検定法の確立が要請される。しかしながらHCGの国際標準品は設定されているにも拘らずその生物学的測定法は定められておらない。ここにその検定法の確立が極めて重要なことである。

本研究は dd マウスならびに近交系マウスを用いて HCG に対する生物学的反応（卵巣の出血濾胞・黄体形成反応，卵巣および子宮重量反応）ならびにその生理的，遺伝的要因について基礎的研究を行ない国際単位表示による HCG の力価の生物学的検定法を確立しようとしたものである。

まず，dd マウスを用いて，HCG に対する出血濾胞・黄体形成反応について体重，左右卵巣，季節等の諸要因を考慮し検討した結果 HCG 1.5～6.0 IU の用量範囲で定量的に測定することが可能であることが認められた。次に HCG に対する卵巣および子宮重量反応について，新鮮または固定重量を考慮して検討し，卵巣重量反応は HCG の検定に使用出来ず，一方，子宮重量反応は HCG の 0.5～6.0 IU の用量範囲で定量的に測定することの可能性が認められた。

これらの HCG の生物検定において一定精度の成績を得るに必要なマウスの供試数について検討した結果 1 用量 20～30 匹であることが認められた。また，これら生物学的反応を誘起するに要する HCG の作用時間を抗 HCG 血清による遮断実験法を用いて検索した結果，黄体形成反応，出血濾胞反応，子宮重量反応はそれぞれ 15，24，40 時間であることが認められた。次に HCG 検定における上述の生物学的反応について比較検討を行い，出血濾胞・黄体形成反応の優位性が認められた。

最後に HCG に対する生物学的反応についてマウスの系統ならびにその成長過程について比較検討し，各系統マウスの HCG に対する出血濾胞・黄体形成反応は 21 日令で高い反応を示し，18 日令前後において質的变化がみられ，また 24 日令において HCG の用量差による差異はみられない。さらに HCG に対する卵巣および子宮重量反応に関して各系統間の交雑試験を試みた結果，これらの反応はポリジーンにより支配される加算的遺伝子効果にもとづくことが認められた。

以上本研究は HCG 製剤の生物学的力価の測定法に関して基礎的関連要因をくわしく検索し多くの知見を加えるとともにわが国の HCG 製剤の検定法の確立に寄与するところが大きい。よって審査員一同は著者に農学博士の学位を与えるに充分価するものと判定した。