

抗 HCG 家兎血清のラット性周期および 妊娠に及ぼす影響

Effects of Anti-HCG Rabbit Serum on the Estrous Cycle and Pregnancy in the Female Rat

新潟大学医学部産科婦人科学教室

川 越 慎之助 Shinnosuke KAWAGOE 布 川 修 Osamu NUNOKAWA
広 井 正 彦 Masahiko HIROI 竹 内 正 七 Shoshichi TAKEUCHI

概要 生物の生殖現象には gonadotropins や steroid hormones が複雑に関与しているが、習慣性流産や機能性不妊症と呼ばれるものの中には免疫学的な機序が関与しているものもあると考えられる。この観点から著者らは HCG を家兎に投与して抗 HCG 血清 (hemagglutination reaction で 1:5120 以上) を作製し、この血清を性周期の正しい Wistar 系メスラットおよび妊娠中のラットに投与してその影響を観察した。その結果次の成績が得られた。

(1) 抗 HCG 血清は寒天ゲル内拡散法で HCG の他に、ラット LH とも交差反応を示し、HMG とともに沈降線がみられた。

(2) この血清を正常性周期を示すメスラットの発情前期の午前 9~10 時に投与すると、皮下注では 0.2ml 以上、静脈注射では 0.1ml 以上で大部分のラットは性周期が抑制され anestrus となった。

(3) 妊娠ラットに対し、妊娠第 1 日目から 5 日間抗血清を腹腔内に投与すると、1 日 0.3ml では 9 例中 2 例 (22.2%) に、0.5ml では 7 例中 2 例 (28.6%) に胎仔の死亡や conceptus の種々の障害像を認めた。

(4) 妊娠第 1 日目から 10 日間の連続投与では 1 日 0.3ml で 5 例中 2 例 (40%)、0.5ml では 7 例中 4 例 (57.1%) と高率に上記の様な妊娠の異常が生じた。

(5) 妊娠後半の第 13 日から第 17 日までの 5 日間抗血清 0.5ml を投与した群では異常は認められなかった。

これらの成績は生殖現象に及ぼす免疫の関与を示唆すると共に、不育症や不妊症などの病態を解明する上での資ともなると考えられる。

緒 言

gonadotropin (以下 G と略) 療法に際し、抗体が産生されて次第に効果が無くなることが知られている。こうした当該ホルモンの作用を中和、減弱させる物質は antihormone と呼ばれて Selye ら (1934a,b), Bachmann ら (1934) や Parkes ら (1936) により発表されてきている。その後も異種動物の G でラット、マウス等を受動あるいは能動免疫化すると、オスでは精子産生や libido の低下、睪丸の萎縮がみられること、メスでは性周期、排卵が阻害されることが報告された (Quadri et al. 1966, Wakabayashi et al. 1966, Talaat et al. 1969)。また、抗 LH 抗体を妊娠中のラッ

トや家兎に投与すると着床の阻害や妊娠の中絶が起こることも報告されている (Spies et al. 1967, Hayashida et al. 1963, Loewit et al. 1969a)。

免疫学の進歩と共に、こうした蛋白性ホルモンの抗原性を利用してホルモン測定法として応用されているが、近年、生殖という複雑な生物現象を免疫学の立場から解明しようとする試みも盛んである。生殖のメカニズムを免疫学的アプローチのみで解明し得るものではないが、所謂、Tyler (1967) の提唱する immunoreproduction というこの領域は受精、着床、妊娠分娩といった一連の生殖過程について免疫学的方法で分析解明しようとする分野といわれている。さらには、排卵や性周

期に関しても抗ホルモンを用いてその機構の神秘を解き明かそうとする研究もあり、著者らも抗HCG抗体のラットの性周期、妊娠に及ぼす影響を検討したので報告する。

実験材料および方法

I. 抗体作製法

HCG(APL, Ayerst laborat.) 80mgを2mlの生理的食塩水に溶解し、これと同量の complete Freund's adjuvant(Difco)とをよく混合して emulsion を作り、成熟オス家兎の皮内あるいは皮下の数個所に分割注射した。これを1週間間隔で4回繰り返し、最後の注射から7~10日後にHCG(同上)50mgを生食水4mlに溶解して booster injection を静脈内に行なった。その後、10日後に耳静脈より採血して抗体価をHCG感作赤血球凝集反応で検定し、1:5,120以上の場合には頸動脈より採血、血清を分離した。抗体価の低い時は1:5,120以上になるまで booster injection を繰り返した。この抗血清は使用まで-20°Cに保存した(図1)。

図1 抗HCG家兎血清の作製法

Preparation of Rabbit Anti-HCG Serum
 HCG(APL)80mg dissolved in 2ml saline solution
 |
 emulsified with 2ml of complete Freund's adjuvant
 |
 injected intradermally and subcutaneously to
 mature male rabbit four times at weekly intervals
 |
 10 or 14 days after the final injection, booster
 injection administered intravenously(APL 50mg
 with 2ml of normal saline)
 |
 one week after the booster injection, blood
 collected from the ear arteries
 |
 the antiserum were checked on antibody titer
 with using tanned red-blood-cell hemagglutination
 reaction
 |
 hemagglutination titers were 1:5120 or higher
 |
 bled from the jugular artery
 |
 antiserum pooled and stored at -20°C until use

なお、この血清の特異性はOuchterlony (1969)の寒天ゲル内拡散法で検定した。

II. 実験動物

実験には生後100日前後の Wistar 系成熟メスラットを用い、4~5周期腔スメアを観察して4~5日の規則正しい性周期を示すもののみ実験に供した。

III. 実験(1) 抗血清の性周期に及ぼす影響

上記の整調な性周期を示すメスラットを1群6匹ずつ8群に分類し、proestrusの9.00A.M.~10.00A.M.に抗HCG血清0.05, 0.1, 0.2, 0.3mlを背部皮下あるいは尾静脈より静脈内に投与した。その後もひき続き9.00A.M.にスメアを採取して性周期の変化を観察した。

IV. 実験(2) 抗血清の妊娠に及ぼす影響

成熟メスラットを生殖能力を有するオスラットと同居させて毎朝スメアの観察を行ない、estrusで精子の認められた日を妊娠第1日(Day 1)とし、この日より抗HCG家兎血清を次の各群に分類して腹腔内に注射した。

Group 1; 抗血清(anti-HCG rabbit serum, AHS)の0.1mlをDay 1~Day 5に投与した群。

Group 2; AHS 0.3mlをDay 1~Day 5に投与した群。

Group 3; AHS 0.5mlを同様に投与した群。

Group 4; 正常家兎血清(normal rabbit serum, NRS) 0.5mlをDay 1~Day 5に投与した群。

Group 5; AHS 0.3mlをDay 1~Day 10に投与した群。

Group 6; AHS 0.5mlを同様に10日間投与した群。

Group 7; ARS 0.5mlをDay 1より10日間投与した群。

Group 8; AHS 0.5mlをDay 13~Day 17の5日間投与した群。

その後、Group 1~7ではDay 14に、Group 8ではDay 19に開腹して妊娠の状態を観察した。

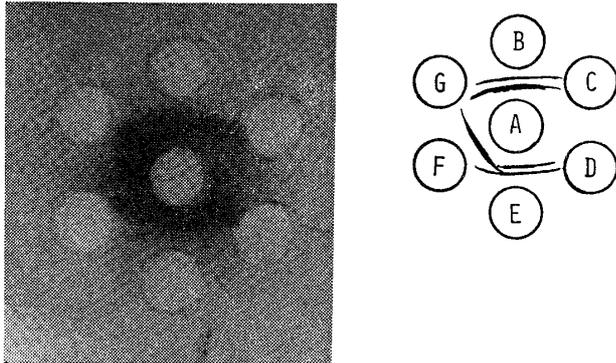
実験成績

I. 抗血清の特異性

Ouchterlonyの寒天ゲル内拡散法で抗HCG家

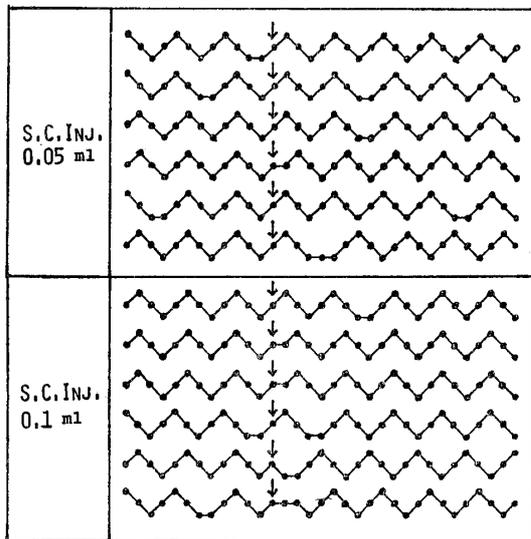
兔血清のラットLH, FSH, prolactin, ならびにHCG, HMGとの交差反応を検討した結果, HCGおよびラットLHに対しては二本の沈降線を形成し, HMGとの間にも一本の沈降線が認められた. ラットFSH, prolactin とは交差反応がみられなかった (図2).

図2 Ouchterlony 法による抗HCG血清の分析



A: anti-HCG serum, B: rat-LH, C: rat-FSH, D: normal rabbit serum, E: HCG, F: HMG, G: rat-Prolactin.

図3 発情前期に抗HCG血清0.05, 0.1ml を皮下投与した時のラット性周期の変化. (曲線の上段は estrus, 中段は proestrus, metestrus, 下段は diestrus を示す.)



II. 性周期に対する影響

(1) 皮下注射の例では, 図3~4に示す様に抗血清 0.05, 0.1ml の投与では性周期に殆んど影響を及ぼさないが, 0.2ml 以上では大部分のラットで排卵は抑制された.

図4 抗HCG血清 0.2, 0.3ml 皮下投与によるラット性周期の変化.

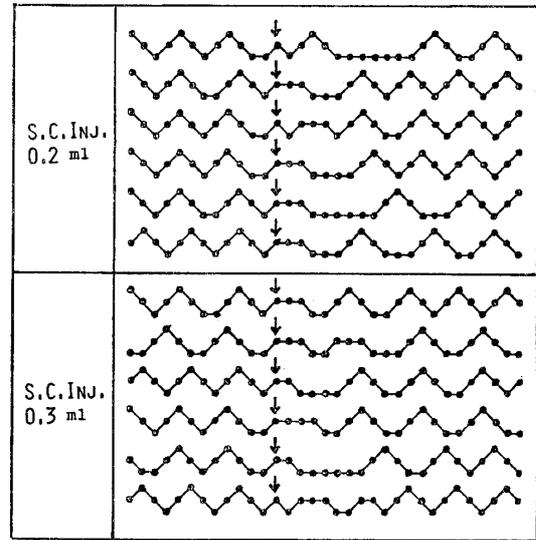
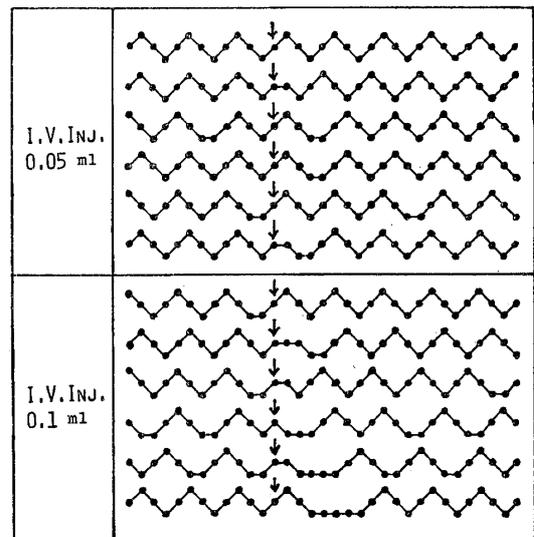


図5 抗HCG血清の静脈内投与によるラット性周期の変化. 0.1ml 投与により一部で性周期の抑制がみられる.

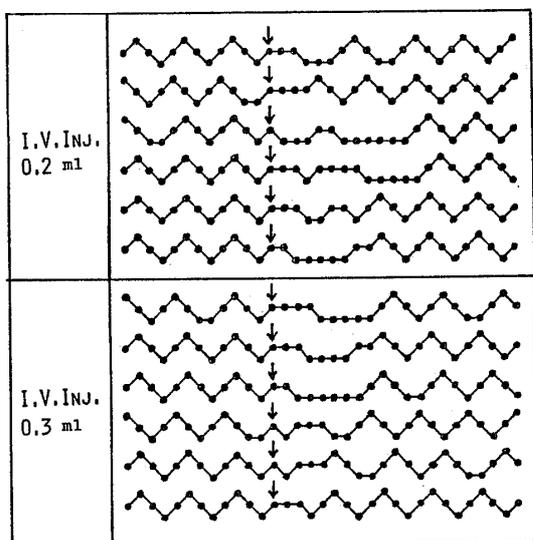


(2) 静注の場合には図5~6に示す如く, 抗血清 0.1ml でも6例中5例で排卵がブロックされ, 0.2, 0.3ml 投与では anestrus の状態が長い例で2週期以上におよんだ.

III. 妊娠に対する影響

表1に示す如く, 妊娠初期に5日間投与した群では, AHS 0.3ml 投与群で9例中2例に, 0.5ml 投与群で7例中2例に流産や胎仔の死亡, 吸収などの妊娠の異常が認められた. この様

図6 抗HCG血清 0.2, 0.3ml を静注した時の性周期の変化。性周期は著明に抑制され、anestrus となる。



な異常はAHS 0.3ml を10日間連続投与した群 (Group 5) で5例中2例に, Group 6の 0.5ml 投与例では7例中4例と高率に認めた。

正常家兎血清投与群やAHSを妊娠後半期に投与した群では共に妊娠に対する影響はみられなかった。

考案および結語

性周期の調節や妊娠の維持機構には gonadotropins(G) や steroid hormones が複雑に関与していると考えられる。一方,下垂体Gを異種動物に投与すると,その recipient 動物は次第にGに insensitive となること,また,その動物の血清を

無処置の動物に投与すると後者もGに insensitive になることが Collip 一派 (Collip et al, 1934, Selye et al. 1934a,b, Bachmann et al. 1934) により報告され,抗体の生ずることが示唆された。したがって,精製されたGに対する抗体を用いれば或る一種のGの作用のみを抑制し得て,そのGの生理作用を検討することも可能である。

Laurence ら (1968, 1969) はウシLHを adjuvant と共にメスラットに投与し,能動免疫を施すことで発情周期が消失し,排卵がブロックされること,このラットの卵巢組織所見では卵胞の発育は殆んど抑制されていないが,黄体組織の欠乏が著明であつたと報告している。また,抗ウシLH家兎血清を用いて受動免疫しても同様であつたという。Boudrel(1961)やYoung ら (1963) もヒツジLHで家兎を免疫し,その血清をメスラットに投与して diestrus となることを報告しており,メス家兎でも抗LH血清を交尾直後に投与すると排卵が生じないし,HCGやLHを投与しても排卵が誘発されなくなると述べている。しかし,抗血清の投与を90~120分遅らせると排卵がみられるという (Quadri et al, 1966, Betteridge et al, 1971, Mori et al, 1967)。これはマウスに於いても同様である (Sasamoto, 1969)。これらの成績はブタ,ウシ,ヒツジらのLHに対する抗血清が内因性ならびに外因性のG(LH)の作用を中和することを示すと共に,能動免疫によるものは異種動物のLHと内因性のLHとに共通の抗体

表1 抗HCG血清のラット妊娠に及ぼす影響

| Group | Serum | Injection Dose(ml) | Days of Gestation for Injection | No. of Pregnant Rats | No. of Aborted Rats |
|-------|-------|--------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------|
| 1 | AHS | 0.1 | 1-5 | 5* | 0 |
| 2 | AHS | 0.3 | 1-5 | 9 | 2/9 (22.2) |
| 3 | AHS | 0.5 | 1-5 | 7 | 2/7 (28.6) |
| 4 | NRS | 0.5 | 1-5 | 5 | 0 |
| 5 | AHS | 0.3 | 1-10 | 5 | 2/5 (40.0) |
| 6 | AHS | 0.5 | 1-10 | 7 | 4/7 (57.1)** |
| 7 | NRS | 0.5 | 1-10 | 5 | 0 |
| 8 | AHS | 0.5 | 13-17 | 10 | 0 |

AHS: anti-HCG serum, NRS: normal rabbit serum,

* certified on 14 days of gestation, ()** abortion rate,

図7 正常家兔血清投与 (a) と抗HCG血清投与 (b) による妊娠第14日目の子宮の変化. (a) では異常が認められないが (b) では胎仔の数も少なく、黒ずんで既に死亡しているのが判る.

(a)



図7—(b)



による autoimmune phenomenon も解されよう.

著者らはHCGを adjuvant と共に家兔に投与して免疫し、その抗HCG血清をメスラットの proestrus の9.00~10.00A.M. に投与することで高率に anestrus となり排卵の生じないことを認めた. この抗血清はラット LHとも交差反応を示したことから、下垂体性 LHの排卵作用を阻止したものと推定される. anestrus の状態は長い例では2週期以上にもおよんだが、Bindon (1970) の報

図8 抗HCG血清投与を受けた妊娠ラットの胎盤. 一部に於いて necrosis に陥っている(右側).



告ではウサギ γ -globulin の半減期が5日であり、抗体もその間存続するということから理解される.

正常メスラットでは estrus の1.00~2.30A.M. に排卵が起こり、proestrus の2.00~4.00P.M. に critical periodが存在するといわれているが(Evrett, 1961, Hoffman et al. 1965) Boudrel ら (1963) も抗ヒツジ LH家兔血清を排卵推定の36時間前から皮下注射すると、注射を続けている間 estrus が抑えられると報告している. Kelly ら (1963) も proestrus の1.00~4.00P.M. で抗血清を投与したところ、膣スメアでは estrus を示すが、排卵はブロックされたと述べている. このことは LH-surge に必要な estrogen の分泌は起こっていても排卵ホルモン (LH) の作用が抑制されたことを示すものであり、Schwartz ら (1967, 1970) も同様に1.00P.M. あるいは3.00~4.00P.M. に抗血清を投与したラットでは LH の放出が起こっていても排卵がみられず、5.00P.M. に投与したラットでは全例排卵があつたと報告している. 一方、diestrus で投与した場合にはより少量の抗血清を用いても排卵は抑制され、膣スメアでも角化細胞の出現が認められなくなる. したがって、estrogen の分泌も抑制されたものと推定される. また、排卵推定日に下垂体 LH の含有量をみると、diestrus に投与した群 (A) では14.7 μ g, proestrus の午後に投与した群 (B)

では11.4 μ g, 無処置群 (C) で10.4 μ g, このC群の proestrus の時期には14.2 μ g であることから, A群ではLHの放出の起きていないことを示し, 腔角化作用の認められないことからしてもLH放出の trigger と考えられる estrogen の分泌障害による排卵抑制と推察される. B群の排卵抑制は血中レベルでのLHの中和作用によると考えられ, したがって, この様な例では estrus の発現をみても不思議ではない. 著者らの例では proestrus の午前中に投与したところで estrus の出現が認められず, estrogen の分泌も阻止されたものと思われるが, これら抗LH, 抗HCG抗体が如何なる機序で estrogen の分泌を抑制するのかは明確にされていない.

抗G抗体の妊娠に対する影響については, 1937年に Rowlands (1937) がウシの下垂体抽出物に対する抗家兎血清を妊娠中の家兎に投与することで着床の阻害や胎子の rejection が起こることを報告している. その後, Spies ら (1967) はヒツジLHの抗家兎血清を妊娠家兎に対し, 交尾後3~11日あるいは11~18日に毎日静注すると, 妊娠黄体の退化と胎子の完全な吸収とが起ると述べている. 著者らは家兎の抗HCG血清 0.5ml を妊娠ラットの妊娠第1日目から毎日10日間腹腔内に投与して, 57%に胎子の死亡や流産を認めている. Hayashida ら (1963) によれば, 抗ヒツジLH家兎血清を妊娠ラットの腹腔内に第1日目から5日間あるいは6日目より11日目まで投与して, 前者では着床の阻害, 後者では着床部位の reabsorption がみられたと報告している. しかし, 妊娠後半の第13~15日目の投与では影響がみられなかつたという. Loewit ら (1969a) も抗ウシLH家兎血清で同様の結果を得ている. 著者らも妊娠第13日目から5日間前記抗血清 0.5ml を連日腹腔内に投与したが, 妊娠に何ら影響を認めなかつた. また, Spies ら (1967) は抗LH血清と同時に progesterone を投与した家兎では妊娠は正常に維持され, これは妊娠初期に卵巣摘除を行なつて progesterone を投与しても同じ結果が得られると述べている. さらに, 抗血清+estra-

diol の投与を受けた家兎でも妊娠の中絶は起きないという. これらのことから, 妊娠初期では下垂体LHの作用が抗体により中和されて妊娠黄体の機能が維持されず, ステロイド産生が不十分となり妊娠が継続されないのであり, 後期では胎盤からG様作用の物質が分泌されるので抗G血清の影響を受けないものと推定される. これはラットで妊娠の第11日以前に下垂体摘除を行なうと妊娠が継続されないのに, それ以後では下垂体を摘除しても妊娠の状態に変化がないという報告 (Penczar et al, 1933, Selye et al, 1933, Sammelwitz et al, 1961) によつても裏付けられる. 著者らの用いた抗HCG家兎血清の影響も, 抗血清がラットLHと交差反応を示すことから, 同様の機序によるものであろう.

さらに, 抗LH抗体投与時に於ける卵巣の20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -OHS DH) や Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (Δ^5 -3 β -OHS DH) の変化を検討した報告もみられる (Loewit et al, 1969b, Chang et al, 1971). すなわち, 妊娠初期には progesterone 産生の急激な増加と 20 α -OH progesterone の低下がみられるが (Fajer et al, 1967), 両者の interconversion には 20 α -OHS DH が関与し, 妊娠中にはこの酵素活性は初期から急激に低下して分娩の直前までは検出不能となる (Loewit et al, 1969b, Kidwell et al, 1966). 妊娠黄体中にこの酵素活性が証明されることは黄体の変性か機能低下を意味するものとされている (Wiest et al, 1968). 一方, Δ^5 -3 β -OHS DH はこれと正反対のパターンを示し, 妊娠後半期には活性が上昇する (Loewit et al, 1969b). ラットの妊娠第7~11日に抗LH血清を投与すると胎子の死亡, 吸収の起こることは前述の通りであるが, このラットの卵巣では 20 α -OHS DH は強い活性を示し, Δ^5 -3 β -OHS DH は非妊時の値と同様のレベルに低下している. 抗血清と同時に progesterone を投与したラットでは妊娠は正常に維持され, これら酵素活性も正常で 20 α -OHS DH は検出されず, Δ^5 -3 β -OHS DH は上昇している. また, 第14~18日に抗血清を投与しても妊娠に影響はみられ

ないが、この時の酵素活性にも変化は認められない (Loewit et al, 1969b).

これらのことからラットの妊娠黄体の機能維持にLHが重要な役を演じ、抗LH、抗HCG抗体がその作用を中和し、妊娠の継続を不能にするものと思われる。

以上、抗HCG血清のラットの妊娠、排卵に及ぼす影響について検討したが、これら抗G抗体を用いてGの生理作用の検討、不妊、不育症の免疫学的アプローチ、さらには抗Gによる避妊などを考える上で意義あるものと思う。

本論文の要旨は47年度、第17回日本不妊学会総会に於いて発表した。

文 献

- Bachmann, C., Collip, J.B. and Selye, H.* (1934): Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 32, 544.
- Betteridge, K.J.* (1971): J. Endocr., 51, 505.
- Bindon, B.M.* (1970): J. Endocr., 46, 221.
- Boudrel, G.* (1961): Gen. Comp. Endocr., 1, 375.
- Boudrel, G. and Li, C.H.* (1963): Acta Endocr., 42, 473.
- Chang, C.C., Badawy, S. and Laurence, K.A.* (1971): Fertil. Steril., 22, 663.
- Collip, J.B. and Anderson, E.M.* (1934): Lancet, 226, 76.
- Everett, J.W.* (1961): Sex and Internal Secretion, W.C. Young ed., Williams and Wilkins co., Baltimore vol. 1, p 497.
- Fajer, A.B. and Barraclough, E.A.* (1967): Endocrinol., 81, 617.
- Hayashida, T. and Young, W.P.* (1963): Anat. Rec., 145, 323.
- Hoffman, J.C. and Schwartz, N.B.* (1965): Endocrinol., 76, 620.
- Kelly, W.A., Robertson, H.A. and Stansfield, D.A.* (1963): J. Endocr., 27, 127.
- Kidwell, W.R., Balogh, K. Jr. and Wiest, W.G.* (1966): Endocrinol., 79, 325.
- Laurence, K.A. and Ichikawa, S.* (1968): Endocrinol., 82, 1190.
- Laurence, K.A. and Ichikawa, S.* (1969): Int. J. Fert., 14, 8.
- Loewit, K. and Laurence, K.A.* (1969a): Fertil. Steril., 20, 679.
- Loewit, K., Badawy, S. and Laurence, K.A.* (1969b): Endocrinol., 84, 244.
- Mori, J., Fujisaki, T., Higaki, S. and Hosoda, T.* (1967): Jap. J. Anim. Reprod., 13, 51.
- Ouchterlony, O. ed.* (1969): Handbook of Immunodiffusion & Immunoelectrophoresis, Ann. Arbor Sci. Publ., Michigan.
- Parkes, A.S. and Rowlands, I.W.* (1936): J. Physiol., London, 88, 305.
- Penchartz, R.I. and Long, J.A.* (1933): Am. J. Anat., 53, 117.
- Quadri, S.K., Harbers, L.H. and Spies, H.G.* (1966): Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 123, 809.
- Rowlands, I.W.* (1937): Proc. Roy. Soc. Biol., 121, 157.
- Sammelwitz, P.H., Aldred, J.P. and Nalbandov, A.V.* (1961): J. Reprod. Fert., 2, 387.
- Sasamoto, S.* (1969): J. Reprod. Fert., 20, 271.
- Schwartz, N.B. Gold, J.J.* (1967): Anat. Rec., 157, 137.
- Schwartz, N.B. and Ely, C.A.* (1970): Endocrinol., 86, 1420.
- Selye, H., Collip, J.B. and Thomson, D.L.* (1933): Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 30, 589.
- Selye, H., Collip, J.B. and Thomson, D.L.* (1934a): Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 31, 566.
- Selye, H., Bachmann, C., Thomson, D.L. and Collip, J.B.* (1934b): Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 31, 1113.
- Spies, H.G. and Quadri, S.K.* (1967): Endocrinol., 80, 1127.
- Talaat, M. and Laurence, K.A.* (1969): Endocrinol., 84, 185.
- Tyler, A., Tyler, E. and Denny, P.C.* (1967): Fertil. Steril., 18, 153.
- Wakabayashi, K. and Tamaoki, B.* (1966): Endocrinol., 79, 477.
- Wiest, W.G., Kidwell, W.R. and Balogh, K. Jr.* (1968): Endocrinol., 82, 844.
- Young, W.P., Nasser, R. and Hayashida, T.* (1963): Nature, London, 197, 1117.

(No. 2621 昭48・2・8 受付)