

成熟ラット過排卵卵子の卵管内通過と その發育能に関する研究

三宅金也・内海恭三・湯原正高

(家畜繁殖学研究室)

Received July 1, 1975

Studies on the Transport of the Superovulatory Egg in the Oviduct and Its Following Development in Mature Rat

Kinya MIYAKE, Kyozo UTSUMI and Masataka YUHARA
(Laboratory of Animal Reproduction)

It is well-known that the injection of gonadotrophin results in superovulation in mammal. However, the uneffectiveness in superfetation and subsequent multiple birth by superovulatory treatment has been shown and leaves many of the associated problems. This study was designed to determine the effect of pregnant mare's serum (PMS)-induced ovulation on the rate of egg transport and the rate of egg cleavage in the rat oviduct. The normalcy of superovulated eggs was also investigated by transplantation to the intact recipient.

Multiple ovulation in Wistar mature rat weighing 200 to 250 g was induced by 50 IU PMSG, followed 50 IU HCG 54 hrs. later. Autopsy was performed in 24, 46, 68 and 86 hrs. after the HCG injection. The loops of oviduct were divided into four parts (I to IV) and the fourth was divided into two parts beyond 68 hrs. after the HCG injection to recover the egg.

The rate of transport was accelerated and as a consequence, the 4-cell embryo was expelled into uterus. But the rate of cleavage showed no significant difference from that in the intact oviduct. The egg expelled into uterus seemed to result in the fragmentation or the degeneration on account of unfavourable condition of uterus for the egg, under the control of imbalanced ovarian hormones.

The blastocyst which developed in the ligated oviduct of superovulated rat was transferred to the intact uterus of the pseudopregnant foster mother. Then, the transplanted egg developed into the young to full time. Accordingly, the superovulatory egg was made sure to be normal one, regardless of minor errors of fertilization or others.

It is, therefore, supposed that most early embryonic loss, especially preimplantation embryonic loss, in superovulated mature rat depends on the unfavourable uterine environment rather than the hastened passage of the ova through the oviduct.

緒

言

哺乳動物に過排卵処理を行なった場合、必ずしも産子数が増加するとは限らず、むしろその固有の同腹子数よりも減少することが報告¹⁾されている。これには種々の原因が考えられるが、最も重要な点と思われるのは排卵数の増加にもかかわらず、着床数の低下が起ること、および、その後の胚死亡が増加することなどである。過排卵処理によって卵は生殖器官内を時間

的に早く下降するので子宮内へ入った場合 Premorula stage の卵は子宮内環境に適応できないといわれている。GATES²⁾ (1971) はマウスにおいても、これらのことが着床数の低下の一因であると考えている。卵子の卵管内移行速度は上皮の纖毛活動の程度と、卵管の収縮の程度に影響される。一般にエストロゲンは卵管の運動性を増し、プロゲステロンはその作用を打消す作用を示すといわれているが、動物種によっては逆の報告もあり、これらの作用は単純でないものと思われる。

本研究では卵子の卵管内通過の意義と、過排卵卵子の正常性を明らかにするために、過排卵ラット卵子の卵管内の通過速度とその発育程度を観察した。さらにその卵子の産子への発育を移植によって検索した。

材 料 と 方 法

人工照明 14 時間 (8 a. m. ~ 10 p. m.), 21°C 恒温条件下で飼育し、4 日週期のスメア像を 2 回以上観察した Wistar 系自家繁殖成熟 処女雌を実験に供した。過排卵処理は石橋の法³⁾ (1970) に従って行なった。排卵予定の 12 時間前、即ち発情前期の午後 6 時に HCG (帝臓製ゴナトロピン) 50 IU を腹腔内に注射し排卵を誘起させた。さらにその 54 時間前、即ち休止 I 期の正午に PMS (帝臓製セロトロピン) 50 IU を筋肉内注射して濾胞を発育させた。卵の卵管下降速度を調べるため、HCG 注射後 24 時間、46 時間、68 時間および 86 時間目に屠殺解剖した。成熟ラットの卵管のループ数を平均 16 とし、采側より 4 つ目ごとに分画して 4 区 (ⅠからⅣ) に分けた。68 時間と 86 時間ではⅣをさらに 3 つのループ (Ov. IV-1) と残りのループおよび卵管子宮部 (Ov. IV-II) の 2 区に分けた。各時間ごとに、子宮部を加えた 5 区ないし 6 区を時計皿の生理食塩水中での切りきざみ法によって卵を探索し、各区ごとの卵の分布数と分割状態を観察した。対照として排卵前 8 時間に HCG を注射したと想定して同時刻に自然排卵卵を観察した。次に過排卵卵の正常性を調べるため、PMS 40 IU, HCG 40 IU 過排卵処置ラットの卵管子宮接続部を交配 2 日目に結紮し、5 日目の午前中に卵管から分割卵を回収した。その一部は同期化した精管結紮雄と交配した無処置雌の子宮に移植し、一部は結紮雄交配過排卵処置雌の子宮に移植した。又、対照として自然排卵による子宮卵を回収して正常子宮と過排卵処置子宮に移植した。その後、15 日目の着床胎児数か、或いは分娩後の新生児数を調べた。

結 果 と 考 察

1. 過排卵卵の卵管下降速度

過排卵処置雌の卵管の各分画と子宮での移行中の分割卵の分布を表-1 に示すように対照雌のそれと比較した。

HCG 後 24 時間では、対照の卵管卵のほとんどは卵管Ⅱ区に分布するのに比して、処置区の卵管卵は卵管Ⅰ区やⅢ区にも分布し、Ⅱ区には約 50% しか存在しない。これは卵巢所見で種々の段階の黄体、もしくは排卵点が存在することから、排卵時期がホルモン処理によって不揃いになることを暗示している。とくにⅠ区にやや多いことから、石橋³⁾ (1970) も指摘する排卵の完了する時間が対照より約 6 時間遅れるということが支持される。これは受精不能或いは受精遅延の原因ともなることが想像され、その後の胚発育の障害を起こす可能性もある。排卵後 46 時間を経た胚の分布は対照ではⅡ区とⅢ区に約 60% の胚が存在する。一方過排卵区ではⅢ区

Table 1. Distribution of Superovulated Ova in the Oviduct and Uterus of the Mature Rat

Hours after HCG*	No. of Tested	Treat.	% of Ova Transported through**					Uter.
			Ov. I	Ov. II	Ov. III	Ov. IV		
						I	II	
24	3	Control	8.1	89.2	2.7	0		—
24	3	Superovu.	30.5	53.7	15.8	0		—
46	3	Control	16.7	27.8	36.4	19.4		—
46	3	Superovu.	14.7	16.2	26.6	42.5		—
68	3	Control	—	—	0	91.7	8.3	0
68	3	Superovu.	—	—	0	0	58.7	41.3
86	3	Control	—	—	—	0	68.4	31.6
86	3	Superovu.	—	—	—	0	0	100.0

*Control; after 8 hours plus the time of lapse of ovulation.

**The loops of oviduct were divided into four parts (I-IV), especially the forth was divided into two parts beyond 68 hrs. after HCG.

とIV区に約70%の胚が在る。この時点で既に処置によって胚の卵管内通過が促進されていることが解る。卵子の卵管内移送の調節機構の1つとして、膨大部と狭部の接合部での卵の滞留調節が考えられており、膨大部では胚の移動が早く、狭部では遅くなることが認められており、遅れて排卵しても同時に子宮へ到達するように調節されている。本分画でのII区とIII区の境が接合部と思われるが、本実験からホルモン処置によって膨大部の筋蠕縮運動が亢進して、狭部への移送が速められたものと思われる。46時間後では対照区の90%近くが正常な2-cell卵と思われるが(表-2参照)、過排卵区は70%だけが2-cell卵で、同時に存在する発育の遅れている1-cell卵は受精卵と思われるが、先に示したように排卵の遅延のためか、初期分割がそれだけ遅れているようである。このように分割速度は、卵の卵管内通過とは無関係に排卵後の時間経過に支配されているようであり、過排卵処理によって早くなることはない。

HCG後68時間たてば、対照区では卵の90%はIV-I区に認められる。これは狭部では卵管の下降速度が遅く、子宮への胚の移行は卵管子宮接続部で最も良く調節されているという諸家の結果と一致する。一方過排卵区ではIV-II区(卵管子宮部)に約60%、既に子宮に40%も卵が分布している。次に、卵管から子宮への移行時期と考えられるHCG後86時間(排卵後78時間)では、対照で70%の卵が卵管子宮部に、他は子宮に認められるが、過排卵区では全ての卵が子宮から回収された。このように過排卵処理によって狭部での卵管下降が著しく促進されると共に、卵管子宮接続部での胚の子宮内進入に対する調節作用が行なわれていないものと思われる。利部ら⁶⁾(1973)の報告ではHCG投与後既に48時間で子宮に卵の存在を認めているがそれは非交配雌によるからであろう。信永⁷⁾(1968)は既に過排卵処理による着床率の低下を卵子下降の異常にあることを暗示する観察をしている。逆に石島ら⁴⁾(1967)は家兎の誘起多胎において、エストロゲンの前処置が有効なのは、ゴナドトロピン処置による卵の卵管下降促進をそのエストロゲンが抑制するためであると考えている。このように卵巢ホルモンの作用と卵管下降の調節機能が議論されているが、動物種によって一定していないし、報告者によっても諸説がある。一般に自然排卵の場合は、次の発情によるエストロゲンの作用によって卵が急速に接続部から子宮へ移送されると考えられている。過排卵処理した場合、HCG後68時間や86時間といえども卵巢内に濾胞が存続することから考えて、卵下降促進は卵巢中の後発濾胞による膨大部の胚の移動の促進効果というよりむしろ、それによる狭部や卵管子宮接続部

の胚の移動の促進効果の方が大きいようである。

GREENWALD³⁾ (1961) によって、正常妊娠ラットにおいてもエストロゲンが卵下降を促進する可能性も報告されていることから、卵下降の促進はエストロゲンによる狭部内膜上皮の繊毛運動の増加するためと考えられる。本実験でもエストロゲンによる胚の卵管下降速度の影響を調べるために、正常交配雌の交配時と、24時間後、48時間後の3回、2 μ g/1回のエストロゲンを腹腔内注射して、交配後68時間目に卵管内および子宮内の卵の分布を調べた。その結果、数例においてIV-II区に卵を認め、対照より下降の促進されていることが暗示されたが、多くの例においては、卵管はもとより子宮からも卵は回収されなかった。これはエストロゲン作用によって既に子宮外へ胚が排泄されたことも考えられるが、今後の研究に判断を待たねばならない。

2. 過排卵卵の初期分割速度

卵の分割速度は表-2に示す如く過排卵処理によって促進されていない。HCG 後68時間

Table 2. Cleavage of Superovulated Ova Transported through the Oviduct and Uterus of the Mature Rat

Hours after HCG	No. of Tested	% of Recov.	(Ova of O. P.)	No. of Recovered Ova (%)					
				ZP	1-cell	2-cell	4-cell	8-cell	Morula
24C	3	65	(37/ 57)	1 (3)	36 (97)	0 (0)			
24S	3	59	(50/134)	3 (4)	79 (96)	0 (0)			
46C	3	62	(36/ 58)	1 (3)	3 (9)	32 (89)	0 (0)		
46S	3	55	(68/123)	10 (15)	12 (18)	46 (68)	0 (0)		
68C	3	71	(36/ 51)	1 (3)		2 (6)*	32 (89)	1 (3)**	0 (0)
68S	3	63	(92/146)	7 (8)		4 (4)*	79 (86)	2 (2)**	0 (0)
86C	3	76	(38/ 58)	4 (11)				3 (5)	32 (84)
86S	3	56	(85/151)	2 (2)		6 (7)***		39 (46)	38 (45)

* contains 1~3-cell ova ** contains 5~7-cell ova *** contains 1~7-cell ova

C : Control, S : Superovulation.

で、先に示したように40%は子宮に到達しているが、その分割程度は4-cell卵が86%を占め、対照のその89%とほとんど変らない。又86時間後には、全て子宮に存在するにもかかわらず桑実胚以上の分割を示すものは認められなかった。対照と比べれば半数以上が分割遅延を示している。86時間目は68時間目の分割遅延の割合より、さらにその割合が増加していることから、卵管内を速く通過しすぎたため、卵管の感作が少なかったことによる影響も無視できないが、むしろ子宮内環境が着床前胚にとって不適当であるため、分割遅延を起こし、更に退化変性に至る卵が増加し始めているものと思われる。卵管卵は透明帯を通して卵管液中の高分子物質を取り込み栄養分とし、免疫学的にも血清抗原の感作を受けることが着床前胚に必要とされているが、それらのための感作に要する時間の最低必要時間は明らかにされねばならないだろう。又、卵子が子宮内に到達した時期の正常妊娠子宮では黄体が活動し始め、胚の分割や着床に好影響をもたらすといわれている。しかし過排卵処理子宮では油井ら¹⁰⁾ (1975)が指摘するように卵巣の後発濾胞のために起こる子宮上皮の Estrogen Syndrome から考えても、子宮内の着床前胚の発育は、かような子宮内では障害を受けることは十分に考えられる。以上の結果から、過排卵卵子は処理による何らかの卵管内感作を受けるものと思われるが、その分

割速度には著しい影響を受けていないようである。

3. 過排卵卵の発育能

過排卵処理によって得られた外観上正常分割卵が、正常な産子になり得るかどうかを調べた。過排卵処理をしたラットの結紮卵管より交配5日目に回収した卵は4例平均で卵管片側当たり19個の卵が回収され、約80%は可視的には正常卵と思われた。この正常卵率が表-2の86時間目の過排卵処置子宮より回収した正常分割卵（桑実胚）率より好成績を示したということは、過排卵処置子宮は着床前胚の分割に不適当であることを裏づけている。一般に結紮卵管での胚の発育は初期胚盤胞までは発育するが、それ以後は、栄養細胞の異常発育が認められている。しかも着床に至るための透明帯の除去がかなり遅れることも知られている。本実験から交配後の5日目正午までは過剰の正常初期胚盤胞が回収されたことは従来の説を支持するものである。このようにして得られた胚盤胞を対照偽妊娠子宮と、過排卵処置子宮へ移植した結果、表-3に示すように、対照子宮では、一部は分娩に至らしめたが、妊娠率100%、着床率80%を示した。しかし、処置子宮では一例の生存胎児もえられず、一例に小さな脱落膜腫瘍痕跡を認めたに過ぎなかった。

Table 3. Development of Superovulated Ova in the Foster Mother

Condition of Recipient	Source of Ova	No. of Tested	Foetal Survival* or Birth	
			% Preg.	% Implant
Intact Uter.	Sponta. Ovul. Ova	4	100 (4/4)	81 (29/36)
Intact Uter.	Superovul. Ova	4	100 (4/4)	86 (36/42)
Superovul. Uter.	Sponta. Ovul. Ova	4	0 (0/4)	0 (0/36)
Superovul. Uter.	Superovul. Ova	4	0 (0/4)	0 (0/42)

* Autopsy on the 15th day pregnancy

一方無処置交配雌の子宮から回収した胚盤胞を同様の子宮へ移植した場合、前者と同じように、無処置子宮では妊娠率100%を得たが、処置子宮では妊娠率0%であった。これらの結果から、着床条件の整った子宮であれば、過排卵卵でも、正常に着床前発育をとげた後は、対照卵と変わりなく、途中の死亡もなく、正常な胎児や産子に発育することが認められた。この結果は、杉江⁹⁾ (1973) の家畜の過排卵卵の移植の基本的理念を支持している。しかし過排卵処置子宮への移植の結果から、無処置の正常卵でも、子宮内環境が正常でなければ着床に至らず、着床しても極く初期に斃死するものと思われる。かような子宮では、移植操作による脱落膜腫の形成も少なく、卵の着床期に至ってもなお卵巣に続発濾胞が長期に存続し、エストロゲン Surge に続く、黄体の正常な作用が発現されていないようである。このことは油井ら¹⁰⁾ (1975) も過排卵処置子宮の5日目においてもなお、その上皮や腺組織にエストロゲン過剰所見を得ていることから裏づけられる。

このように過排卵処理による卵子は、一部では形態異常（石橋⁹⁾, 1970）や染色体異常（Fujimoto¹⁾, 1974）も報告されているが、異常ホルモン下で卵管下降速度が促進され、子宮内への進入も早く、しかも子宮内の悪感作のため、退行変性することが明らかとなった。又、過排卵処理による排卵卵の分割速度は対照卵のそれより速くなることもなく、しかも結紮卵管内で高率に正常分割したことからも、一部の異常卵を除いては子宮環境が正常であれば、処置卵でも正常な産子に発育する能力を持っていることが認められた。

要 約

成熟ラットの過排卵卵の卵管下降速度と卵管内発育を観察して、過排卵卵の正常性を検索した。あわせて、過排卵卵の胎児や産子への発育能を明らかにしようとした。

卵管下降速度は HCG 後 24 時間では、卵管膨大部で対照よりやや遅れており、46 時間後には対照では膨大部狭部接合部を中心に存在するが、処置卵管では、狭部下方に集中して、下降速度が促進されている。68 時間では、対照はいまだ狭部にあるが、処置区では既に半数近くが子宮に到達しており、86 時間では最早卵管には卵は存在しない。正常妊娠雌へのエストロゲン単独処置で卵管下降促進が認められた。

卵分割速度は、卵管下降の促進にもかかわらず、対照のそれと変らなかった。従って 68 時間で既に 4-cell 卵のまま子宮内への移行が認められた。86 時間では、対照は卵管子宮接続部に桑実胚として存在するのに比して、処置区では、全て子宮部に桑実胚および 8-cell 卵以下が約 50% ずつ認められた。後者は発育の遅れというよりむしろ、発育途中における斃死卵もしくは退行中の卵と思われた。

結紮卵管より回収した過剰排卵処理による胚盤胞は、正常な宿主子宮では発育したが、処置宿主子宮では一例の発育をも認めなかった。一方対照子宮より回収した胚盤胞は処置宿主子宮では全く発育せず、脱落膜腫も少例に認めたに過ぎない。

このように成熟ラットにおける過排卵処理は卵管卵の発育速度に対する影響は少ないが、卵の卵管下降速度とくに狭部から子宮への移行を著しく促進する。卵管感作時間の減少することというよりむしろ、胚の発育に不都合な環境の子宮に卵が早めに進入することが、子宮内での着床前胚の発育の障害になっているようである。このことは、結紮卵管内で胚盤胞に発育した過排卵処置胚でも正常な子宮環境下では、新生児の発育へと全うできるという観察から裏づけられた。

文 献

- 1) FUJIMOTO, S., N. PAHLAVAN & W. R. DUKELOW: J. Reprod. Fert. 40, 177—181 (1974)
- 2) GATES, A. H.: Methods in Mammalian Embryology (J. C. DANIEL eds.) 119—126, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1971)
- 3) GREENWALD, G. S.: Endocrinol. 69, 1068—1072 (1961)
- 4) 石島芳郎・伊藤雅夫・平林 忠・佐久間勇次: 家繁誌 13 (2), 71—75 (1967)
- 5) 石橋 功: 家繁誌 16 (1), 14—19 (1970)
- 6) 利部 聡・石橋 功: 日畜会報 44, suppl. 65 (1973)
- 7) 信永利馬: 家繁誌 14 (3), 77—87 (1968)
- 8) 佐久間勇次・石島芳郎・平野公一: 日農獣報 20, 59 (1965)
- 9) 杉江 信: 畜試年報 8, 171—180 (1970)
- 10) 油井良文・内海恭三・湯原正高: 日畜会報 46, suppl., 10 (1975)