Histochemical and Autoradiographic Studies on the Ovarian Morphogenesis of Rat

Ichiro KOKETSU

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan
(Director : Professor Shimpei Tojo, M.D.)

In order to elucidate the growth and differentiation process of the rat ovary and its histogenesis, histochemical and autoradiographic studies on the ovarian morphogenesis have been performed, and the following findings have been obtained.

Histological findings: 1) After the neonatal stage, no germ cells could be observed. 2) On the seventh day after the birth the secondary follicles appeared besides the primordial follicles. 3) The tertiary follicles and the primary interstitial tissue appeared about 14 days after the birth. 4) The diameter of oocyte increased with growth of follicles and reached the peak in the tertiary follicles. 5) Vesicular follicles, atretic follicles, and secondary interstitial tissue emerged at about 21 days after the birth. 6) The atretic process of follicles could be classified in three types. The cells of the secondary interstitial tissue were found to come from thecal cells.

Histochemical findings: Increased lactic dehydrogenase activity was observed in the epithelium of primordial, primary and secondary follicles at about three and seven days after the birth. Glucose-6-phosphatase activity was very weak. Increased glucose-6-phosphatase activity, however, was observed in the tertiary follicles. This suggests that anaerobic glycolytic system plays the main role in the carbohydrate metabolism of the small follicular epithelium. In the interstitial cells and thecal cells, in addition to intense steroid 3β -ol dehydrogenase and glucose-6-phosphatase activity the presence of lipid granules could be demonstrated.

Autoradiographical findings: 1) By the migration method, it could be clarified that the follicular and thecal cells come from undifferentiated stromal cells and that the primary interstitial tissue comes from undifferentiated stromal cells. 2) When examined by the pulse labeling method, the follicular epithelium incorporation of ^3H -thymidine was low in the primordial and primary follicles, but rose with the growth of the follicles. The incorporation of ^3H -thymidine, however, decreased in cyst-formed large follicles. The incorporation was noted in the primary but not in the secondary interstitial tissue. In view of the findings that the incorporation of interstitial cells decreased with the rise of the animal's age, it may be presumed that gain in weight of ovarian connective tissue is not necessarily due to the proliferation of mesenchym in situ.

(See pp. 101~114)

ラット卵巢の发育過程に関する機能形態学的研究

神戸大学医学部産科婦人科学教室 (主任 東條伸平教授)

古 結 一 郎

(昭和47年2月22日受付)

卵巢の发育分化過程や組織由来を検討し、以下の結果を得た。

組織学的所見：新生期以後では germ cell は認められず、生後7日目に原始卵胞の他に第二次卵胞が出現した。第三次卵胞、第一次間質腺は生後14日目後から出現した。卵細胞直径は卵胞の发育と共に増大し、第三次卵胞で頂点に達した。胞状卵胞、閉鎖卵胞、第二次間質腺は生後21日目後から出現した。卵胞の閉鎖過程より、第二次間質腺細胞は内膜細胞に由来するとの結果を得た。

組織化学的所見：生後3日目、7日目頃の原始、第一次、第二次卵胞上皮に強い LDH 活性をみたが、G-6-PDH 活性は極めて弱かった。しかし第三次卵胞で G-6-PDH 活性の増加がみられた。

このことから小卵胞上皮の糖代謝は嫌氣的解糖系が主体をなすと推察された。間質細胞、内莖膜細胞ではつよい 3β -HSD, G-6-PDH 活性の他に脂質顆粒を証明できた。

Autoradiograph 所見：migration 法より卵胞、内莖膜細胞、第一次間質細胞は未分化間質細胞に由来することを明かにした。pulse labeling 法により、 ^3H -thymidine は第一次間質腺には取り込みがあったが、第二次間質腺では取り込みが見られなかった。卵巢結合組織の増量は間質細胞のとり込みが経時的に減少するので必ずしも in situ mesenchym の増殖に基くものではないと推測された。

は じ め に

従来、幼時期や小児期の卵巢は静的な器官と見做されていた。しかしこうした見方は卵巢の二大機能即ち卵成熟能とステロイド産生能のうち、主に後者に立脚したもので、形態学的にはこの時期から極めて動的な分化、形成過程が惹起されている。著者はこの間の実態をより詳細に追究することにより卵巢各要素の組織由来、その形態分化の示唆する機能的意義、ひいては幼仔卵巢の内分泌機能の実態、卵巢の tumorigenesis などを考察する上での重要な基礎的な知見が得られるであろうと考え、以下の如き研究を行った。

I 実 験 方 法

A. 実験材料

Sprague-Dowley 系雌ラットを用いたが、これらの膺開口期は、生後ほぼ第6～7週であつた。

B. 実験方法

1. 組織学的検索方法として Hematoxylin-eosin 染色, Mallory-Azan 染色, 鍍銀染色法 (Pap 氏法, 鈴木氏法) を、組織化学的検索方法として, Sudan black 染色, Sudan III 染色, 3β -HSD 活性 (Wattenberg の変法, 基質: DHA), G-6-PDH 活性 (Nachlas の変法), LDH 活性 (Nachlas の変法) を行い、また、 ^3H -thymidine を用いて autoradiograph を作製、目的に応じ migration 法 (生直後のラットに $10\mu\text{Ci}$ を腹腔内投与し、2時間、3日、7日、14日後に屠殺)、あるいは pulse labeling 法 (^3H -thymidine を体重 1gr 当り $10\mu\text{Ci}$ 腹腔内投与し、2時間後に屠殺) を実施した。

また、卵巢各要素の thymidine の取り込み状態を知るべく標識細胞数を数え、同一細胞群内の百分率、すなわち、thymidine index で表示した。

2. 卵胞直径を接眼 micro-meter を用いて測定し、卵数は卵巢の最大面標本から240倍の顕微鏡写真を作

成し、これから算定した。

3. 胚上皮高の計測は、対物レンズ百倍の拡大で接眼 micro-meter を用いて計測し、生直後の厚さを100%として以後の時期における胚上皮層の厚さを百分率で表わし、比較検討した。

4. 卵胞の發育段階は卵細胞を囲む卵胞上皮細胞数によつてFig. 2の如く前原始卵胞、原始卵胞、第一次卵胞、第二次卵胞、第三次卵胞および胞状卵胞に分類した。

II 実験結果

1 生後1日目の卵巣

A 組織学的所見：生直後のラット卵巣の構成要素は、主に卵細胞、未分化間質細胞、及び胚上皮の三者で、卵細胞は門部に少く、皮質外側部に Gitter 線維に囲まれ一塊となつて群集し、胚上皮直下には横走する嗜銀線維が認められた。卵細胞の核分裂状態は late prophase, ことに diplotene stage のものが多く、また一塊として密接する卵細胞はたかいに同調するかの如くほぼ分裂状態を一にしていた。

また卵細胞の核が濃染し、辺縁のいびつな閉鎖卵が中等数認められた。こうした卵細胞巢の周囲には紡錘形の、細胞質に比較的乏しい未分化間質細胞が分布していた。また、ことに生直後のこの時期から生後7日迄の間、胚上皮内に多数の卵細胞を、同時に上皮直下の嗜銀線維を破るが如く上皮層内に侵入中の卵細胞を、さらに、上皮が解離し、これを経由し、卵細胞が卵巣嚢内へ放出されたと見てよい所見も認められた。

他方血管系の發達は門部、皮質を通じて極めて貧であつた。

B. Autoradiograph 所見：pulse labeling 法による thymidine の取り込みは、卵細胞では全く認められなかったが、未分化間質細胞には強い取り込み (thymidine index : 25%) を見た。このほか、胚上皮細胞にも取り込みがある (thymidine index : 5%)。

Fig. 1. Thickness of the germinal epithelium, the diameter of oocyte and oocyte reduction.

2 生後3日目の卵巣

A 組織学的所見: 前述の卵細胞集団は互いに分離しはじめ、卵細胞の核分裂状態も dictyate stage に移行しているものが多かった。

卵胞発育は一般に皮質中央部ほど良好で5個前後の卵胞上皮細胞を有するもの (preprimordial follicle) から10個前後の卵胞上皮細胞で卵の周囲を完全にとりかこむ原始卵胞, さらに第一次卵胞が存在していた。しかしこの時期では、まだ第三次卵胞は無論のこと、第二次卵胞も見られなかった。

胚上皮細胞は依然高円柱状, 偽重層状を呈し, 中等数の分裂像が見られた。

B 組織化学的所見: G-6-PDH, LDH, 3β -HSD 諸酵素活性について検討したが, 胚上皮細胞のみに LDH 活性が見られた。

Fig. 2. Count of follicles per ovary according to the number of granulosa cells in the section where the nucleolus of the oocyte was seen

Name	oocyte	pre primordial follicle	primordial follicle	primary follicle	secondary follicle	tertiary follicle small	tertiary follicle	
number of granulosa cells	0	4	5	10	11- 20	21 - 80	81 — 180	180 —

C. Autoradiograph 所見: migration 法で, ^3H -thymidine の原始卵胞上皮への移動が証明できた. さらに pulse labeling 法での原始卵胞細胞の ^3H -thymidine の取り込み率は未分化間質細胞や migration 法での卵胞細胞の夫に比し著明に低い値を得たが preprimordial follicle の取り込みは高い値 (thymidine index 20%) を示していた.

3 生後7日目の卵巣

A 組織学的所見: 卵細胞核の核小体がみられる卵胞はほぼ最大割面に一致するという知見に基き, 核小体のみられる卵胞の卵胞上皮細胞数を数え, その發育状態を追求した結果 Fig. (2) の如く, 卵胞上皮細胞数10~20の第一次卵胞が最も多く, 21~40の卵胞がこれにつぎ, 以下41~60, 61~80の第二次卵胞の順であつた. 即ち原始卵胞, 第一次卵胞のほか, 第二次卵胞が出現したが, こうした一部の第二次卵胞では卵胞上皮基底膜の閉鎖がしばしば不完全で, この部では不正形~半円錐形の卵胞細胞集団をみ, 間質細胞との境界は必ずしも明瞭でなかつた. また第二次卵胞の外側部を不完全ながらとりまく未分化間質細胞は莢膜細胞様の形態, 配位を示していた. また不完全ながら, Call-Exner body 初期段階の腔形成をみる卵胞もある.

卵細胞は完全に分離され, その核分裂状態は全て核小体の明瞭な dictyate stage に移行し, 第二次卵胞の卵細胞直径は原始卵胞, 第一次卵胞に比し明らかに増大していた.

一方, 未分化間質細胞は肥大し, 間質細胞様となる. また, 生後3日目で偽重層を呈していた胚上皮は, 一層の立方~円柱状の配列を示し, mitosis も減数していた. このほか原始卵胞が胚上皮に突出し, その尖端部の卵胞細胞は消失し, 著しく扁平化した胚上皮のみで覆われている像も見られた. なお, 胚上皮の down growth 像は著者の全観察期間を通じみられなかつた.

B 組織化学的所見: 胚上皮, 卵細胞, 卵胞上皮, 未分化間質細胞に LDH 活性を認めたが, その活性強

Table 1. Histochemical findings of rat ovary (1)
3 β -HSD activity

	7th day	14th day	21st day	28th day	40th day	54th day
germinal epithelium	—	—	—	—	—	—
primordial follicle	—	—	—	—	—	—
primary follicle	—	—	—	—	—	—
secondary follicle	—	—	—	—	—	—
tertiary follicle	granulosa theca	÷~+ +	— +~++	— +~++	— ++	— ++
vesicular follicle	granulosa theca	/	— +~++	— or + +~++	— or + ++	— or + ++
primary interstitial tissue	/	+~++	+	÷	/	/
secondary interstitial tissue	/	/	++	++~++	++	++
atretic follicle	granulosa theca	/	+ ++	+ ++~++	+ ++	+ ++
corpus luteum	/	/	/	/	/	/

G-6-PDH activity

	7th day	14th day	21st day	28th day	40th day	54th day
germinal epithelium	—	—	—	—	—	—
primordial follicle	—	±	+	+	+	+
primary follicle	—	±	+	+	++	++
secondary follicle	—	±~+	+	+	++	++
tertiary follicle	granulosa theca	+	+	+	++	++
		±~++	++	++	+++	+++
vesicular follicle	granulosa theca	/	+	+	+	+
		/	++	++	++	++
primary interstitial tissue	/	++	++~+++	÷	/	/
secondary interstitial tissue	/	/	++	++~+++	+++	+++
atretic follicle	granulosa theca	/	+~++	+~++	+~++	++
		/	++	++	++	++
corpus luteum	/	/	/	/	/	++

LDH activity

	7th day	14th day	21st day	28th day	40th day	54th day
germinal epithelium	+	+	+	+	+	+
primordial follicle	++	+	+	+	+	+
primary follicle	++	+~++	+	+	+	+
secondary follicle	+	+~++	++	+~++	++	++
tertiary follicle	granulosa theca	++	++	++	++	++
		±	±	±	±	±
vesicular follicle	granulosa theca	/	++	++	++	++
		/	±	±	±	±
primary interstitial tissue	/	+~++	++	÷	/	/
secondary interstitial tissue	/	/	+++	+++	+++	+++
atretic follicle	granulosa theca	/	—	—	—	—
		/	++	+++	+++	+++
corpus luteum	/	/	/	/	/	++

度は原始卵胞上皮が最も強く、第二次卵胞上皮、胚上皮、未分化間質細胞、卵細胞の順に弱く、卵細胞ではミトコンドリア部に相当して活性がみられた。他方卵胞上皮、未分化間質細胞の G-6-PDH 活性は依然殆んど認められず、 3β -HSD 活性も陰性であつた。

C. Autoradiograph 所見：migration 法で銀粒子の第二次卵胞上皮への移行が証明できた。また、pulse labeling 法による所見では、卵胞發育が進んだ卵胞ほど卵胞上皮の ^3H -thymidine の取り込み率が増加し、未分化間質細胞では、生直後や生後3日目と比較して減少していた。

4 生後14日目の卵巣

A 組織学的所見：この時期では卵胞腔を有する第三次卵胞が出現したが、卵胞の發育状況はFig. (2)の様である。第三次卵胞の卵胞上皮は第二次卵胞に比しより多層化し、後記する ^3H -thymidine 取り込みの増加と一致して多数の有糸核分裂像を見、その強い増殖能を窺わしめると共に、分泌能の出現、すなわち、Call-Exner bodies や卵胞腔の形成がみられた。他方、こうした第三次卵胞の卵胞上皮直下の基底膜は完全に閉鎖していた。また基底膜の外側には紡錘形、類上皮様の細胞が数層の層形成をなし、卵胞を取り囲み求心性に配列していたが、これが莢膜細胞で、本層には血管網が認められた。このように明瞭な莢膜細胞は卵胞の卵腔形成周辺期に出現したが、卵透明帯の形成もこの時期から明確化する。第三次卵胞の卵細胞は第二次卵胞の夫よりさらに増大し、ほぼ成熟卵胞卵大に達し、Mallory Azan 染色で透明帯や卵胞液は青染していた。

他方、間質ではことに莢膜細胞と隣接する部位で著明に肥大した間質細胞が島状又は円錐状の細胞集団として分布していた。

これが第一次間質腺で、その細胞周囲は微細な嗜銀線維に囲まれ、後述する第二次間質腺細胞にくらべ、胞体はより eosin 嗜好性で、核/原形質比はより大であつた。また、この時期以降門部に中等大血管が出現した。

B 組織化学的所見：脂質顆粒は莢膜層に断続的に存在し、ことに第一次間質腺に豊富に認められたが、卵胞上皮では検出できなかった。一方、 3β -HSD 活性はこの時期の第三次卵胞上皮に極めて弱いながら活性をみとめ、また第一次間質腺では強い、莢膜細胞では中等度の活性が見られた。また間質腺の脂質と 3β -HSD 活性の出現時期の相関を明らかにすべく11日目卵巣を検討した結果、 3β -HSD 活性は陽性であつたが Sudan black 陽性顆粒は陰性であつた。LDH 活性は第三次卵胞上皮、第一次間質腺に強い活性を見、ことに卵胞腔に接する上皮細胞程強く、外側部は弱かつた。また莢膜層の活性は卵胞細胞より弱かつた。

これに対し、G-6-PDH 活性は第一次間質腺では極めて強く、卵胞上皮の活性は卵胞の發育度と比例して弱いながら増強し、莢膜細胞では卵胞上皮より活性の明かに高い部位と弱い部位とが混在し、胚上皮の活性は極めて低かつた。

C. Autoradiograph 所見：migration 法では卵胞上皮の他に莢膜細胞、第一次間質腺細胞にも ^3H -thymidine の移動が見られ、このことから莢膜細胞や第一次間質腺細胞が未分化間質細胞に由来することが示唆された。

他方 pulse labeling 法による胚上皮、原始卵胞、第一次卵胞、第二次卵胞の thymidine index は Table 2 の様で、7日目の卵巣に比して減少していたが、第三次卵胞上皮のみは25.2%と明らかに高値を示し、莢膜層は未分化間質細胞より低い値を示した。また、第一次間質腺細胞には ^3H -thymidine 陽性細胞と陰性細胞とがあり、陰性細胞は総じて肥大した胞状の原形質を持ち、 3β -HSD 活性もより豊富な様であつた。

5 生後21日目の卵巣

A 組織学的所見：卵胞の發育状況はFig. (2)の様で、卵胞上皮細胞数101~140の第三次卵胞が最も多く、また、少数であるが卵丘をもつ卵胞も認められた。また閉鎖卵胞もこの時期から出現した。一方、原始卵胞は著しく減数していた。そしてこのような卵胞發育に平行し内莢膜細胞もより肥大し、その層内細毛管系の発達もより顕著となつた。また間質では、第一次間質腺の他に中心部に腔を形成し、核の円形で、核/原形質比は小さく、細胞質の胞状かつ明調な細胞集団が出現した。これが第二次間質腺で、第一次間質腺と異つて本組織では全く有糸核分裂像を認めなかつた。さらに閉鎖卵胞から第二次間質腺への移行像としてほぼ次

Table 2. Thymidine index

	germinal epithelium	primordial follicle	primary follicle	secondary follicle	tertiary follicle		vesicular follicle		undifferentiated stroma cell, stroma cell	atretic follicle		primary interstitial tissue	secondary interstitial tissue
					granulosa	theca	granulosa	theca		granulosa	theca		
1st day	5 %	/	/	/	/	/	/	/	25 %	/	/	/	/
3rd day	10 %	6.1%	16.2%	/	/	/	/	/	26.8%	/	/	/	/
7th day	8.5%	6.7%	21.3%	22.6%	/	/	/	/	16.0%	/	/	/	/
14th day	6.5%	4 %	12.1%	20.6%	25.2%	10.3%	/	/	17.5%	/	/	10 %	/
21st day	1.5%	0.9%	4.8%	17.5%	27.5%	13 %	28.9%	17.3%	11.2%	2.2%	3.9%	9.1%	/
28th day	1.3%	0.5%	4.1%	16.4%	28.2%	11.9%	18.1%	13.1%	5.8%	3.4%	5.3%	/	/

の如き3段階の像が認められた。即ち、先ず基底膜層が肥厚又は不明瞭化し、顆粒膜細胞層に膠原線維が侵入し、莢膜細胞の肥大、増殖が認められる (type 1)、卵胞上皮細胞の一層の変性所見の他に著明な莢膜細胞の肥大、増殖が認められるもの (type 2)、ついで、腺腔に接して顆粒膜細胞基底膜がなお明瞭に遺残しているが、内莢膜細胞は間質腺細胞様に肥大している像 (type 3) などである。

B 組織化学的所見：脂質顆粒の存在部位は第一次間質腺、第二次間質腺、莢膜細胞層、閉鎖卵胞などであり、莢膜細胞層の顆粒密度は、卵胞の大きいもの程高く、発育卵胞の顆粒膜細胞は閉鎖卵胞と異なり脂質を証明できなかった。他方間質腺では最強の反応が得られた。 3β -HSD 活性も14日目の卵巣に比し急増した。すなわち、莢膜細胞、第一次間質腺、第二次間質腺、少数の閉鎖卵胞の顆粒膜細胞に強い活性が検出できたが、14日目の卵巣の小型第三次卵胞でみられた 3β -HSD 活性はこの時期以後消失し、莢膜細胞層では卵胞発育に比例して卵胞の周囲にそい、断裂状に反応を示すものから卵胞の全周にわたり検出できるものもあつた。一方、間質腺の反応組織量も増していた。また、第一次間質腺と第二次間質腺との活性を比較すると、後者の反応組織量がより多かつた。

G-6-PDH 活性の反応部位は莢膜細胞層、第一次間質腺、第二次間質腺、顆粒膜細胞層で、また第一次、第二次間質腺の活性強度は単位組織量当りではほぼ等しかつた。

一方、LDH 活性は第二次間質腺で最も強く、原始卵胞においても、G-6-PDH 活性に比して明らかに強い活性を認め、胚上皮にも活性が認められた。

C Autoradiograph 所見：pulse labeling 法による ^3H -thymidine の取り込みは第二次間質腺ではこれを欠くのに対し、第一次間質腺では取り込みがみられた。また、第三次卵胞上皮の index は高く、特にこの時期の胞状卵胞は最高の値を示した。他方閉鎖卵胞の取り込みは有意に減少していた。

一方、生後16日目に ^3H -thymidine を腹腔内投与 ($2\mu\text{Ci}/\text{gr}$) した21日目の所見 (migration 法) では第二次間質腺細胞への ^3H -thymidine の移動が証明できた。本所見は第二次間質腺が閉鎖卵胞の内莢膜細胞が卵胞細胞に由来することを意味する。

6 生後28日目の卵巣

A 組織学的所見：生後21日目の卵巣に比して間質

結合織や血管系が増加し、卵胞の發育はさらに進み、閉鎖卵胞も増加し、間質腺の占める割合も急激に増加していた。また、21日目卵巣と異なり第一次間質腺は消失し、第二次間質腺が間質腺の主体をなし、多数の囊胞化間質腺が認められた。

B 組織化学的所見：脂質は莢膜細胞、閉鎖卵胞、間質腺に陽性で、その反応強度については莢膜層での顆粒密度は21日目の卵巣と比べほぼ同様であつたが、間質腺は明らかに高かつた。 3β -HSD 活性も脂質顆粒とほぼ同様な分布を示したが、H. E. 所見上、閉鎖卵胞と見做し難い大卵胞の顆粒膜基底層にしばしば 3β -HSD 活性が出現し、同部の G-6-PDH 活性も強い反応を示した。また G-6-PDH 活性はこの時期以降卵状卵胞卵にも出現し、LDH 活性はむしろ減少の傾向がみられた。他方明らかに閉鎖過程の進行した、粗大な脂質顆粒を証明できる変性卵胞上皮では本酵素を証明できなかつた。

C. Autoradiograph 所見：原始卵胞上皮の ^3H -thymidine index は殆んど消失し、第一次卵胞、第二次卵胞での index もこれ以前の時期に比しやや減少する傾向にあつた。

このほか、卵状卵胞も21日目の夫に比し、取り込みは明らかに減少しており、本所見は 3β -HSD 所見とあいまって卵胞の成熟、機能分化を示唆する。また、第二次間質腺では全くとり込みを欠いていた。

胚上皮の取り込みの推移に関しては上皮の一層の薄化 (Fig. 1) と共に最低値を示した。

7 生後40日、54日目の卵巣

A 組織学的所見：卵胞はさらに發育し、ことに皮質周辺に多数の囊胞卵胞をみ、間質腺も増量していた。黄体は生後54日目で出現していた。この時期の大卵胞では内莢膜層のいわゆる thecal holding を見るものもあつた。胚上皮は生直後の厚さの65%に薄化しており、卵巣の發育に逆比例してその厚さが減少するという結果を得た。

B 組織化学的所見：脂質、 3β -HSD 活性は28日目の卵巣とほぼ同様な分布を示したが、黄体が出現すると、 3β -HSD 活性、脂質の主反応部は黄体となつた。

また胚上皮の LDH 活性は明らかに減少していた。

III 考 按

Fig. 3 は生直後から性成熟期にかけての卵巣の形態学的変化をまとめたものであるが、この成績から卵数、卵胞の發育状況、間質腺の出現時期、その發育状態、胚上皮層などの所見が卵巣分化の形態学的指標となり、さらにこれら卵巣各組織要素間の動的移行を追加考察することにより、より正確な把握が可能であることがわかる。

卵細胞数の経令的な減少はすでに Zuckerman (1962)¹⁾ ら、Johnes (1961)²⁾ の研究で確立されているが、この卵減数現象と下垂体性 gonadotropin の相関につき、Johnes (1961)³⁾ は垂別マウスはその減数速度が遅延すると報じている。ところで、このような卵減数現象は、著者の検索成績からも明らかに新生仔期に特に顕著で、この時期の卵減数機構に関し、Franchi ら (1962)⁴⁾ は卵変性やこれに付随しておこる phagocytosis 機構を重視しているが、このさい先に述べた胚上皮經由性卵放出現象も同時に極めて重要な意義を持つと思われる。その根拠は卵減数現象の顕著なこの時期に多数の胚上皮内卵が認められたからである。胚上皮中の卵細胞の存在が卵細胞産生組織としての胚上皮説の有力な根拠を提供したことは述べるまでもないが、卵放出を示唆する一連の組織学的過程、胚上皮自体に有糸分裂像を認めても、卵自体の有糸分裂を欠き、また同時期の卵管内に卵細胞を検出できた林ら (1971)⁵⁾ の成績に鑑み、本所見は卵放出過程の一断面をとらえたものと考えられる。

胚上皮自体の経令的变化に関しては、生直後は偽重層を呈し、高円柱状であつたが、生後一週から明瞭な単層の立方上皮となり、膈開口期前後ではむしろ扁平化し、その LDH 活性も生後日数を経るに従い減少したが、この所見は Vincent (1948)⁶⁾ の結果とほぼ符合する。

つぎに、卵細胞の核分裂状態とその分離現象について考察すると、生直後群集密在する卵細胞の核分裂状態は early prophase stage、ことに diplotene stage にあるものが多く、生後3日目で卵細胞が分離しはじ

Fig. 3

めると同時にその多くは dictyate stage に移行していた。

この成績は生直後のマウス卵細胞を検討した Peters (1969)⁷⁾、生後3～4日目ラット卵細胞について観察した Mandel⁴⁾らの結果とはほぼ一致しており、また Franchi (1970)⁸⁾もヒト卵細胞は胎生20～30週頃から、late pachytene、さらに diplotene stage に移行するが、卵細胞への卵胞細胞の完全な付着、すなわち、原始卵胞の形成はその核分裂が late pachytene、又は diplotene stage に移行するまで決しておこらないと述べている。したがって、卵細胞の核分裂状態はその分離と極めて密接な関係のあることがわかる。また卵相互間の核分裂の同調傾向の機序に関し卵胞形成以前の時期において、Weakly (1967)⁹⁾はハムスター、Zamboni (1968)¹⁰⁾は家兎、Stegner (1970)¹¹⁾は人で夫々卵相互間の細胞間橋の存在を報じているが極めて示唆に富む報告である。

つぎに、卵胞の生後発育過程に関し生後3日目から原始卵胞と第一次卵胞の出現を、7日目前後から第二

次卵胞, 第14日目前後で第三次卵胞の出現を見たが, 卵胞形成初期段階での興味ある所見として, *preprimordial follicle* の卵胞上皮は *pulse labeling* 法で, ほぼ未分化間質細胞に近い高い取り込みを示した。しかし原始卵胞や第一次卵胞の取り込みは低く, 卵胞細胞が未分化間質細胞に由来するという著者の見解からすれば, 本所見は未分化間質細胞の *contact differentiation* を意味すると思われる。この点中井 (1971)¹²⁾ は一日令の原始卵胞上皮で高い取り込みを見ているが, この成績は未分化間質細胞をも計数した可能性が大きい。

しかし, その後の發育段階における卵胞上皮の *thymidine* 取り込みはその發育の進展, すなわち第二次, 第三次卵胞の順により高くなり, 卵胞の増大が卵胞液の急激な貯溜に基く囊胞状大卵胞では却つて減少した。また卵胞細胞の發育と卵細胞發育の相関に関する著者の成績では, 原始卵胞, 第二次卵胞, 第三次卵胞と卵胞の發育に平行し, 卵細胞直径は増大し, ほぼ第三次卵胞で成熟卵胞卵細胞大に達した。一方, 卵胞上皮の組織化学的所見をみると, 生後7日目頃の原始, 第一次, 第二次卵胞の卵胞上皮で強い *LDH* 活性がみられたが, 3β -HSD 活性は極めて弱く, このことから, この時期の小卵胞上皮の糖代謝は嫌氣的解糖系が主体をなすと推察されたが, 生後14日目では *Pentose Monophosphate Shunt* 上の *key enzyme* である *G-6-PDH* 活性が第三次卵胞上皮に出現し, 同部に見られる ^3H -*thymidine* 取り込みや核分裂像の増加とあわせ考え, このような *G-6-PDH* 活性の急激なかたまりは主として五炭糖回路からの *Ribose-5-Phosphate* の核酸合成に関与すると推定できたのみならず, *G-6-PDH* 活性の出現する第三次卵胞以後では急激な卵胞直径の増大が見られないので, 卵細胞發育に関与する嫌氣的解糖系のもつ重要性も示唆された。

また14日目第三次卵胞の卵胞上皮に微量の 3β -HSD 活性を証明できたが, この知見は *Presl* (1970)¹³⁾ らの成績と異なり, *Brandau* (1970)¹⁴⁾ の結果と一致しており, この意義に関しては不明である。もちろん, 本所見は生後28日目頃にあられる胞状卵胞の周辺顆粒膜層にみられる 3β -HSD 活性とは脂質, *G-6-PDH* 活性を欠く点異質の性格をもつもので, 後者は周知の通り卵胞上皮のルテイン化と見做されている。(*Amorosso*, 1955¹⁵⁾; *Bryans*, 1955¹⁶⁾; *Jirásek*, 1970¹³⁾.)

次に莢膜細胞層の形成に関し第二次卵胞ではその形成は明瞭でなく, 一部の卵胞に一層の *epitheloid* 様細胞の莢膜層様の配列が見られたが, 本細胞は脂質顆粒, 3β -HSD 活性陰性であつた。しかし第三次卵胞では明瞭な莢膜細胞層が出現し, この内莢膜細胞には 3β -HSD 活性陽性細胞と陰性細胞とがあり, また *Pap* 染色で血管網の形成がみられた。この成績は内莢膜の分化が *antrum formation* の時期に相前後しておけると言う *Brambell* (1928)¹⁷⁾, *Harrison* (1962)¹⁸⁾, *Peters* (1969)⁷⁾, *Jirásek* (1970)¹³⁾ らの結果と符合する。ただ, 最近 *Stegner* (1970)¹¹⁾ はマウス卵巣で *Pedersen* (1968)¹⁹⁾ らの規定する *type 3a* 卵胞に微細構造所見上内莢膜細胞の分化を見ているが, これは著者の前述した 3β -HSD 活性陰性の類莢膜細胞に相当するものと思われる。

また *Dawson* (1951)²⁰⁾ はラット卵巣の生後18日目までの *theca* は *Shiff* 反応, *Schultz* 反応共に陰性で, 内分泌学的に *non-reactive* としているが, *Jirásek* (1970)¹³⁾ ら, *Küpper* (1967), *Schlegel* (1967)²²⁾ は生後10日~14日の腔形成卵胞の *theca* に 3β -HSD 活性を認めており, この点を考慮し第一次間質腺を慎重に除外した著者の本実験でも, 3β -HSD 活性の局在を証明できた。

つぎに, 第一次間質腺の形成は第三次卵胞の出現に相前後して, 不規則な島嶼状, あるいは円錐状に分布する *epitheloid* 様の細胞集団として出現したが, この部位は極めて強い 3β -HSD 活性, 脂質顆粒, *G-6-PDH* 活性を保有し, *steroid* 産生組織と推定できた。また本組織は内莢膜に比し *G-6-PDH* 活性が総じて明かに強く, また ^3H -*thymidine* とり込みがやや低い。

この成績は *Rennels* (1951)²³⁾ や *Dawson* (1951)²¹⁾ のラットを用い *Schiff*, *Schultz* 反応陽性, *Sudan* 好性の間質腺組織が生後10日目頃から出現するという報告, さらに 3β -HSD の局在を指標として検討した *Jirásek* (1970)¹³⁾, *Schlegel* (1967)²²⁾ らの結果と一致するものである。

ところでこのような *steroid* 産生能をもつ内莢膜又は第一次間質腺細胞の出現と関連し, 新生仔期卵巣の内分泌機能に関する従来の諸家の見解をここであわせ考察してみると, この時期卵巣は機能的に静止状態に

とどまり、少くとも生後10~20日目までは外因性、下垂体性 gonadotropin や PMS に反応せず、第三次卵胞以前の卵胞の発育過程には gonadotropin を必要としないとの見解が有力であつた^{1),24),26)}。しかし生後1~5日目で去勢したラットに去勢前葉の形成をみた Presl (1963) の報告²⁶⁾、また第三次卵胞や第一次間質腺が出現する生後8日目から血中 estrogen をはじめて検出した Presl (1967) の成績²⁷⁾、さらに radioimmunoassay 法で血中 LH 含有量を測定し、生後7日以後急激に増加するという Weisz (1970)²⁹⁾ らの報告はいずれも生後10日以内に下垂体性 gonadotropin の放出を生じ、しかもその刺激のもとに卵巣性 estrogen が分泌され、下垂体、性腺相互間には feed back 機構すら存在することを示唆している。著者も³⁰⁾ 生後3~7日間 NIH-FSH-S₇ を連日投与し生後7日目卵巣で卵胞細胞の LDH 活性の急峻な増加や、ほぼ14日目に相当する卵胞発育をみており、しかもこの際第一次間質腺細胞の形成は顕著でなかつた。この結果は anti-gonadotropin を同時期に投与した Lunenfeld の成績 (1970)³¹⁾ とほぼ符合する。したがつてこの時期卵巣の gonadotropin 依存性は前記した第二次間質腺が出現し、閉鎖卵胞の出現する生後20日目前後に比較するとはるかに低いにしても、新生仔期卵巣の形態分化に対し、gonadotropin が極めて重要な役割を演じることが推定できた。

ところで、卵胞、内膜、間質細胞の組織由来に関しては従来定説を欠き、卵胞細胞の組織由来については、1) 胚上皮説、2) 間葉細胞説、3) その混合説、4) いわゆる blastema 説、内膜細胞に関しては、1) 間質細胞説、2) 間質腺細胞説、さらに間質腺細胞では、1) 胚上皮や卵胞細胞をもふくめた上皮説、2) 間質細胞説、3) medullary cord 説、4) 内葉膜細胞説などの諸説が唱えられていた^{1),32),33)}。しかしながら、これらの諸説は、通常の組織発生学的または比較解剖学的検索手段を主体としたものであるから、動的過程の追跡という見地から自ずと一定の制約が残されていた。

そこでこの点に注目し著者の migration 法を併用した結果を記述すると次の様である。

まず、卵胞、内膜細胞の細胞由来に関しては、1) 生直後の卵巣で、卵細胞を圍繞する未分化間質細胞に強い ³H-thymidine のとり込みをみ、2) これが夫々卵胞上皮、内膜細胞に移動し、3) 少くとも生後では胚上皮のいわゆる down/growth 像の認められないなどの理由から、マウスを用いた Peters (1967)⁷⁾、1969³⁴⁾ の成績と同様に、両細胞は未分化間質細胞という共通の細胞から分化するであろうとの見解を得た。

また、間質細胞に関しては、第一次間質腺と第二次間質腺とで全く異なる結果を得、前者は未分化間質細胞、後者は内葉膜細胞に由来すると見なし得た。この際第一次間質腺に関しては、基底膜閉鎖以前の時期に、間質組織に向い円錐状に突出する卵胞上皮細胞集団が卵胞から離脱、間質腺化する可能性を考慮する必要もあるが、電顕的に5日目未分化間質細胞 (マウス) では steroid hormone 分泌細胞としての移行的な超微細構造をすでに具備しているという Stegner (1970) の報告¹¹⁾ とあわせ考える時、やはり未分化間質細胞に由来すると考えるのが妥当であろう。

他方本細胞は生後28日目の卵巣では消失していたが、その詳細に関しては今後検討の余地が残されている。

また、第二次間質細胞の由来については第三次卵胞の閉鎖の出現に一致して、第二次間質腺が現われ、また migration 法のみでの成績では内膜細胞のほかにも卵胞細胞由来を除外できなかったが、同時に閉鎖過程の推移を追跡することにより、本組織は閉鎖時に増殖、肥大する内葉膜細胞から transform するという Rennels (1951) ら²³⁾ と同一の見解が得られた。

最後に生後日数をへるに従つて pulse labeling 法による間質細胞の thymidine index の低下をみたにかかわらず、特に生後21日以後間質組織の著しい増量がみられたことは、この時期を境として門部血管が激増するという事実とあわせ考えて、この時期にみられる結合組織の増量が in situ mesenchym の分裂増殖に依存せず、恐らくは内部血管の侵入に伴うその随伴性結合組織に大きく依存していることを想起せしめる。

しかし、このほか閉鎖卵胞が生後21日目頃から出現する点、卵胞閉鎖に起因する結合組織の増量の可能性も否定できない。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました東條伸平教授、また直接の御指導、

御鞭撻を載いた林要助教授に深甚なる謝意を捧げます。又研究面で貴重な御教示、御協力を賜りました本学第二解剖学教室溝口史郎教授、菊井悠充先生に深謝します。また数々の御助言、御協力を頂いた協同研究者の鷺尾元夫先生、武木田博祐先生、谷立夫先生、及び川辺氏、笠谷氏に感謝致します。

(本論文の一部は昭和46年6月、第4回近畿核医学研究会、昭和46年10月第7回国際不妊学会、昭和46年10月第19回日本内分泌学会西部総会で発表した。)

文 献

- 1) Franchi, L.L., Mandel, A.M. and Zuckerman, S.: The Ovary. vol. 1 (1962) 1, Academic Press, New York, London.
- 2) Johnes, E.C., and Krohn, P.L.: J. Endocr, 21: 469, (1961).
- 3) Johnes, E.C. and Krohn, P.L.: J. Endocr, 21: 467, (1961).
- 4) Franchi, L.L., Mandel, A.M.: Proc. roy. Soc, 157: 99, (1962).
- 5) 林 要, 古結一郎, 武田博祐, 谷 立夫, 東條伸平: 第19回日本内分泌学会西部部会総会, (1971).
- 6) Vincent, W.S.: Am. J. Anat, 83: 137, (1967).
- 7) Peters, H.: Acta. Endocr, 62: 98, (1969).
- 8) Franchi, L.L.: Scientific Foundations of Obstetrics and Gynecology (1970), 107, William Heidemann Medical Books LTD. London.
- 9) Weakley, B.S.: J. Anat. 101: 435, (1967).
- 10) Zamboni, L. & Gondos, B.C.: J. Cell Biol, 36: 276, (1968).
- 11) Stegner, H.E.: Gonadotropins and Ovarian development. (1970) 232, E & S Livingstone, Edinburgh & London.
- 12) 中井利昭: 日産婦誌, 23: 397, (1971).
- 13) Jirásek, J.E., Presl, J., Horsky, J.: Acta Histochem. 37: 162, (1970).
- 14) Brandau, H.: Gonadotropins and Ovarian development, (1970). 307, E & S Livingstone, Edinburgh & London.
- 15) Amoross, E.C.: Brit. Bull, 11: 117, (1955).
- 16) Bryans, F.E.: Endocr. 48: 117, (1955).
- 17) Brambell, F.W.R.: Proc. Roy. Soc. 103: 258, (1928).
- 18) Harrison, G.: The Ovary. vol 1 1 (1962), 143, Academic Press, New York, London.
- 19) Pedersen, T., and Peters, H.: J. Reprod. Fert, 17: 555, (1968).
- 20) Dawson, A.B. and McCabe, M.: J. Morph, 88: 543, (1951).
- 21) Küppers, S.: Acta. histochem, 27: 267, (1967).
- 22) Schlegel, R.J., Farias, E., Russo, N.C., Moore, J.R. and Gardner, L.I.: Endocrinology, 81: 565, (1967).
- 23) Rennels, E.G.: Am. J. Anat, 88: 63, (1951).
- 24) Smith, P.E.: Am. J. Anat, 45: 205, (1930).
- 25) Hisaw, F.L.: Physiol. Rev., 27: 95, (1947).
- 26) Presl, J., Horsky, J., Henzl, M., and Jirasek, J.: J. Endocr, 26: 287, (1963).
- 27) Presl, J., Horsky, J., Henzmann, J., Mikulas, I., and Henzl, M.: J. Endocr. 38: 201, (1967).
- 28) Weisz, J., and Ferin, M.: Gonadotropins and Ovarian development (1970), 339, E & S Livingstone, Edinburgh & London.
- 29) 林 要, 古結一郎: 日産婦誌, 投稿中, (1972).
- 30) Lunenfeld, B., and Eskhol, A.: Proceeding of 6th World Congress on Fertility and Sterility, (1970), 148, Gordon and Breach, New York and London.
- 31) Brambell, F.W.R.: Marschall's Physiology of Reproduction. vol 1. part 1, (1969), 511, Longmans, London.
- 32) Fischel, A.: Z. ges. Anat. abt. 1., 92: 34, (1930).
- 33) Peters, H. and Pedersen, T.: Fertil and Steril, 18: 309, (1967).
- 34)

Explanation of Plate

Fig. 1 : Ovary at birth (H.E. stain) $\times 140$

The ovary consists of oocyte, undifferentiated stromal cells, and pseudostratified germinal epithelium.

Fig. 2 : Ovary at birth (Pap stain)

In the outer layer of the cortex, oocyte in the late prophase stage are aggregated ($\downarrow$), surrounded by Gitter fibers.

Fig. 3 : Ovary at birth (autoradiograph) $\times 280$

Autoradiograph of the ovary two hours after injection of ^3H -thymidine on the day of birth. The oocytes are unlabelled but many stromal cells are labelled and the cells of germinal epithelium are labelled also.

Fig. 4 : Ovary of a 3 day old rat (Pap stain) $\times 280$

The oocyte are beginning to be separated each other. Maceration ($\downarrow$) of argentophil fibers immediately below the germinal epithelium are observed. (Refer to Fig. 2)

Fig. 5 : Ovary of a 7 day old rat (autoradiograph) $\times 280$

By the migration method. The epithelium of primodan follicle is labelled. ($\downarrow$)

Fig. 6 : Ovary of a 3 day old rat (Pap stain) $\times 140$

In addition to primodan follicles and primary follicles, secondary follicles begin to appear. The basement membrane of the secondary follicle is incomplete ($\downarrow$), and the boundary with the interstitial cells are not distinct. The nuclei of oocyte has shifted to the dictyate stage.

Fig. 7 : Ovary of a 7 day old rat (H.E. stain)

The oocyte is thrown out through the germinal epithelium into the periovarian space.

Fig. 8 : Ovary of a 7 day old rat (H.E. stain)

The oocyte is covered only by some cells of the germinal epithelium.

Fig. 9 : Ovary of a 7 day old rat (LDH activity)

Activity is approved in the germinal epithelium ($\downarrow^1$), oocyte ($\downarrow^2$), follicular epithelium ($\downarrow^3$), and undifferentiated stromal cell ($\downarrow^4$). Activity of the primodan follicle is rather stronger than that of the secondary follicle.

Fig. 10 : Ovary of a 7 day old rat (autoradiograph)

By the migration method. The secondary follicle have labelled follicular cells by ^3H -thymidine and many of the stromal cells are also labelled.

Fig. 11 : Ovary of a 14 day old rat (H.E. stain) $\times 140$

The tertiary follicle with the cavity appeared. The basement membrane is complete, and the zona pellucida is formed distinctly. (compared with Fig. 6)

The diameter of oocyte becomes larger. (compared with Fig. 6)

Fig. 12 : Ovary of a 14 day old rat (3β -HSD activity)

Activity in the tertiary follicular cells is weak, but in the primary interstitial tissue is strong. The thecal cells show moderately increased 3β -HSD activity. The germinal epithelium show no reaction.

Fig. 13 : Ovary of a 14 day old rat (G-6-PDH activity)

The primary interstitial tissue shows extremely strong reaction. The thecal cells ($\downarrow$) generally show an evidently strong activity than that of the follicular cells.

Fig. 14 : Ovary of a 14 day old rat (LDH activity)

The tertiary follicular cells show the strong activity, especially in the epithelial cells which are adjacent to follicular cavity. However, the activity of the primary interstitial tissue and the thecal layer is evidently lower than that of the follicular cells. Activity of the germinal epithelium is very strong.

Fig. 15 : Ovary of a 14 day old rat (autoradiograph)

The epithelium of tertiary follicle are labelled by ^3H -thymidine and the thecal cells are labelled by migration method.

Fig. 16 : Ovary of a 14 day old rat (Pap stain)

Hypertrophic interstitial cells are distributed on the lateral side of the internal thecal layer, as the cells groups in islet form ($\downarrow$). Follicular basement membrane is completely formed.

Fig. 17 : Ovary of a 21 day old rat (3β -HSD activity)

Activity in the thecal cells ($\downarrow^1$), primary interstitial tissue ($\downarrow^2$), secondary interstitial tissue ($\downarrow^3$), and granulosa cells of atretic follicle is noted.

Fig. 18 : Ovary of a 21 day old rat (G-6-PDH activity)

Strong activity is noted in the thecal cell layer ($\downarrow^1$) primary interstitial tissue ($\downarrow^2$), secondary interstitial tissue ($\downarrow^3$), and granulosa layer ($\downarrow^4$).

Fig. 19 : Ovary of a 21 day old rat (sudan black stain)

Lipid granules are noted in the primary interstitial tissue ($\downarrow^1$), secondary interstitial tissue ($\downarrow^2$), thecal cell layer ($\downarrow^3$), and atretic follicles.

Fig. 20 : Ovary of a 21 day old rat (Pap stain)

The basement membrane of atretic follicle becomes hypertrophic ($\downarrow$) or indistinct. Hypertrophy and proliferation of the thecal cells is noted (type 1).

($\downarrow\downarrow$ follicles of the normal growth)

Fig. 21 : Ovary of a 28 day old rat (3β -HSD activity)

The secondary interstitial tissue ($\downarrow$) is the main focus of 3β -HSD activity.

Fig. 22 : Ovary of Ovary of a 28 day old rat (G-6-PDH activity)

Strong G-6-PDH activity is approved in the internal thecal layer of the secondary interstitial cells. Follicular cells activity is evidently weaker than that of a 21 day old rat. The activity in the germinal epithelium is very weak.

Fig. 23 : Ovary of a 28 day old rat (Pap stain)

In addition to more degeneration of follicular cells, remarkable hypertrophy and proliferation of thecal cells are observed ($\downarrow$). (type 2)

Fig. 24 : Ovary of a 28 day old rat (Pap stain)

Basement membrane of granulosa cells adjacement to the glandular cavity rest distinctly.

Intimal cells, are hypertrophic like interstitial tissue cells, pre-cystic form of the interstitial tissue. (type 3).

古 結 論 文 附 図(その 1)

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

古 結 論 文 附 図(その 2)

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

古 結 論 文 附 図(その 3)

Fig. 13

Fig. 14

Fig. 15

Fig. 16

Fig. 17

Fig. 18

古 結 論 文 附 図(その 4)

Fig. 19

Fig. 20

Fig. 21

Fig. 22

Fig. 23

Fig. 24