Tohru OKIGAKI: Some microscopical observations on natural and artificial ovulation in mature and immature albino rats (*Rattus norvegicus*). Jap. Jour. Genet. **34** (1959): 15-22

シロネズミにおける排卵、主として性腺刺激ホルモ ンによる人為排卵に関する二三の観察¹⁾

沖 垣 達

北海道大学理学部動物学教室²⁾

昭和33年9月16日受領

Résumé

The present paper is to report the results of some microscopical observations on naturally and artificially induced ovulation in mature and immature rats, with special reference to the number, stage and some other morphological features of ovulated ova.

Based on the data obtained from the observations of the whole 288 adult females under study, the duration of each stage of the oestrus was estimated in average as follows: 56.5 hours for the dioestrus stage, 13.5 hours for the preoestrus stage, 25.3 hours for the oestrus stage, and 13.3 hours for the metooestrus stage. It is then evident that the whole duration necessary for an oestrus cycle is 108.7 hours (approximately 4.5 days) on an average (cf. Table 1). The ovulation seems to be taken place during the period from 12 to 20 hours in the oestrus stage.

The number of eggs discharged at natural ovulation shows a variation from 8 to 10 in the majority of cases, being 8.8 on an average (cf. Table 2). These eggs are 75 to 81 micra in diameter, and possess the second polar spindle at metaphase.

Through the injection of the gonadotropic hormone "Hypohorin" (Teikoku Hormone MFG. Co.), ovulation was artificially induced in mature females, though it was necessary to determine the effective time of hormone application in the oestrus cycle. In an extreme case, a mature rat discharged 40 eggs, 31 from the left ovary and 9 from the right ovary, following the application of 30 rabbit units Hypohorin which was used during the period from the dioestrus stage to the preoestrus stage. A rat which recieved injection at the same dosage in the period from the preoestrus stage to the oestrus stage discharged 37 eggs (26 left: 11 right), while the other laid 19 eggs (9 left: 10 right) by hormone application during the period from the dioestrus stage to the preoestrus stage. The data together with those from some other rats are given in Table 3.

In every case, the ova discharged by hormone injection show cytologically normal maturation: they carry the second maturation spindle which has persisted in the metaphase stage, and have a diameter ranging from 75 to 81 micra.

The artificial ovulation was successfully induced in immature rats 15 to 20 hours after the injection of Hypohorin at a dose of 2-10 rabbit units. The data are shown in Table 4. The eggs discharged by this treatment are nearly normal both in size and in some other morphological aspects, as compared with those from adult rats.

The evidence presented indicates that the ova which were discharged by gonadotropic hormone are essentially similar, not only in nature but also in morphology, to those obtained in natural ovulation.

哺乳類の卵子の成熟、性週期、排卵ならびに受精に関する研究は齧歯類を始めとして、食肉類、翼手類、有蹄類などにおいて多くの業績がある (Allen 1945, Gilchlist & Pincus 1932, Hisaw 1947, Kirkham & Burr 1913, Markey & Hinsey 1936, Pincus & Enzmann 1932, Sobotta & Burckhard 1910)。特に、性週期の変化が陰脂膏検査によって比較的容易に判定できることから (Mandel 1951)、性週期や排卵に

1) 文部省科学試験研究費補助

2) 現住所: 東京都三鷹市国際基督教大学生物学教室

関する研究は主として内分泌学に関係したものが多くようである。排卵および卵子の成熟に関する細胞学的研究はシロネズミ、ハツカネズミなどにおいて詳細に研究されている (Makino 1941, Sobotta 1910)。最近位相差顕微鏡によってその生体的観察も行われている (Austin 1956a, b)。

人為的に排卵を誘起させる実験には、多くの方法があるが脳下垂体前葉ホルモン投与 (Gates 1956, Green 1956, Guthrie & Jeffers 1938, Pincus 1940)、日照時間の調節 (Braden 1957, Browman 1937)、妊娠尿投与 (Pincus 1940) あるいは無機物質投与や電気刺激法などが主なものである。

一方、人為的に体外で直接卵巣から排卵させる実験は両生類において古くから行われている (Nadamitsu, 1953)。最近ではハツカネズミ (Nadamitsu, 1957) やシロネズミ (Okigaki 1958, unpublished) においても成功している。

この実験はシロネズミにおける正常排卵、性週期、卵子の形態と、脳下垂体ホルモンによって誘起した人為的排卵、およびそれによって排卵された卵子について観察したもので、哺乳動物における排卵機構、卵子の機能などについて考察した。

起稿するにあたり、御指導と御助言を賜った恩師牧野佐二郎教授に深く感謝する。実験上の御助言と御援助を賜った田中遊也氏、大貫泰氏ならびに佐藤晶子氏に感謝の意を表する。

実験材料および方法

実験動物には当教室で純系飼育を行っているシロネズミ (*Rattus norvegicus*) を用い、均一結果を期待するためにすべて cbbh 系を使用した。

1) 性週期の観察には膣脂膏検査法を用い、288 個体の雌について毎日 1 回観察した。排卵の有無および排卵数は解剖顕微鏡下で輸卵管を切開して観察した。

2) 人為排卵のためには、帝国臓器製薬の「ヒボホルン」(脳下垂体前葉製剤) を使用した。

すでに性週期をもつ成熟個体では、予備実験の結果、脳下垂体前葉ホルモンの影響の少ない時期があることが判明しているから、主として休止期の後半から発情期の前半の間にヒボホルンを投与した。合計 10-30 家兎単位を数回にわけて注射した。対照実験としては、同様の条件のシロネズミに卵巣ホルモン (オヴァホルモンベンツォアート) を投与した。

幼若個体としては生後 30 日前後 (体重約 45-60 gr) のもので膣の開口のみられないものを使用した。投与量は 2-10 家兎単位、16-24 時間後に屠殺開腹して排卵の有無を観察した。

正常排卵、人為的排卵によって得た卵子は、アレン・ブアン液固定、デラフィールド・ヘマトキシリン-エオジン染色、または生のままで位相差顕微鏡によって生体観察を行った。

観 察 結 果

1) 性週期および正常排卵：膣脂膏検査によって、288 個体の観察の結果、性週期は発情期を中心にして 4 期にわけることができた (Table 1)。すなわち、発情前期 13.5 時間、発情期 25.3 時間、発情後期 13.3 時間、発情間期 56.5 時間であって、性週期は 108.7 時間であった。発情および排卵、交尾などの全く行われない発情間期は 2 日から 8 日にわたるものがあり、発情前期と発情後期は約半日の個体が最も多かった。発情期においては、膣の開口が明瞭でかつ行動が活潑であるために、比較的那样にそれを判定することができる。排卵は発情期の後半、すなわち発情期にはいつてから 12 時間から 20 時間の間に行われるように思われる。この時期に生殖器を摘出して観察すると卵巣が肥大し黄体の形成はない。また輸卵管の一

Table 1. Time relation of the oestrus cycle in the rat (hours).

Stage	Dioestrus	Prooestrus	Oestrus	Metoestrus
Mean hrs. Range	56.5 (192-24)	13.5 (8-12)	25.3 (23-48)	13.3 (4-20)
Mean hrs. of one cycle			108.7hrs. (about 4.5 days)	

部が肥大し，ある場合には透明化しており排卵された卵子群の存在する位置が簡単にみられる (Fig. 1)。この透明な輸卵管肥大部を切開すると濾胞細胞につつまれた卵子数個が飛び出してくる (Fig. 2)。排卵された卵子の数は 12 個体の観察から平均 1 個体につき 8.8 個であった (Table 2)。しかし，左右卵巢から排卵される数を見ると等しくない場合が多く 2:7, 8:3, 6:4, 7:2 などが多い例で，4:4, 4:5 などとも観察された。12 個体では左卵巢から総計 52 卵子，右卵巢から同じく 53 卵子であった。また排卵された卵子は，数個の卵子がほとんど同一の場所に一群となつてみられ，輸卵管の中に一列になつて点在することはなかった。これは排卵時間がほとんど等しく，輸卵管を下降する速度にも大差がないためと考えられる。正常な排卵によって得た卵子はいずれも直径 75-81 ミクロンを示し，固定染色の結果では，いずれにおいても第二分裂中期の染色体像が観察された (Fig. 3-5)。

Table 2. Number of ova discharged at natural ovulation.

Rat No.	Left ovary	Right ovary	Total
1	6	4	10
2	7	2	9
3	2	6	8
4	4	6	10
5	4	5	9
6	5	4	9
7	5	3	8
8	4	6	10
9	4	4	8
10	1	3	4
11	8	3	11
12	2	7	9
Total	52 (Av. 4.4)	53 (Av. 4.4)	105 (Av. 8.8)

2) 性腺刺激ホルモンおよび卵巢ホルモンによる人為的排卵

a) 成体における多数排卵の誘発： 発情間期から発情前期または 発情期の前半の間において，正常排卵数をかなり超過する数の排卵をみた。もつとも多数の排卵をみたのは発情間期の後半から発情前期にかけて，30 家兎単位のプロボリンを 3 回にわけて投与した場合で，左卵巢から 31 卵子，右卵巢から 9 卵子合計 40 個の多数排卵をみた (Table 3)。他の個体では 37 個排卵のもの，19 個排卵のものなどが観察された (Fig. 6)。しかし上記と同一条件で行った別個体でも正常数の排卵をすることもあるから，性腺刺激ホルモンの影響には個体差があるものように考えられる。また発情期から発情後期にかけて投与した場合では，多数排卵は全然みられない。このことから性週期のある時期では性腺刺激ホルモンの効果がない場合があるように思われる。多数排卵の場合も卵子の大きさに大小はなく，正常な成熟をしていることが観察された。すなわち，いずれも第二分裂の中期にあった。

一方，脳下垂体ホルモンの代りに卵巢ホルモン（オヴァホルモンベンツォアート）を注射した対照個体においても全く正常の排卵がみられたのみで，卵巢ホルモンは排卵に関しては第一義的な効果をもたないものと思われる。

b) 幼若個体における人為的排卵： 生後 30 日前後のシロネズミは体重 45-60 gr で，膈の開口はみられず従つて性週期もなく排卵も行われていないことはいうまでもない。この時期にプロボリン 2-10 家兎単位を投与すると 15-20 時間後に排卵が行われることが観察された。幼若ネズミでは卵巢は未熟で小さく，比較的発達した濾胞が数個みられるにすぎないのである。プロボリン投与によって濾胞は急速に発達して 15-20 時間後に排卵があるものよう

Fig. 1. An expanded portion of the oviduct taken at the oestrus stage. Natural ovulation. $\times 40$.

Fig. 2. Three eggs taken from an ovary at natural ovulation. Fresh material. $\times 80$.

Fig. 3. Showing the second maturation spindle at metaphase in a mature unfertilized egg, fixed and stained material. Natural ovulation. $\times 800$.

Fig. 4. Showing the side view of the second spindle with the 1st polar body. $\times 1500$.

Fig. 5. Cross section through the expanded portion of oviduct, showing two eggs discharged. Fixed and stained material. Natural ovulation. $\times 800$.

Fig. 6. Twenty-six eggs artificially ovulated with gonadotropic hormone (hypohorin) in a mature rat. Fresh material. $\times 80$.

Table 3. Polyovulation artificially induced by hypohorin (gonadotropic hormone) injection in adult rats.

Total dose of hypohorin at rabbit unit	Time of hormone injection	Number of ovulated eggs		
		Left ovary	Right ovary	Total
30	3 times from dioest. to preoest.	31	9	40
30	3 times from preoest. to oest.	26	11	37
20	3 times from preoest. to oest.	6	6	12
20	2 times from preoest. to oest.	10	3	13
15	2 times from preoest. to oest.	6	9	15
10	3 times from dioest. to oest.	9	10	19
10	2 times from preoest. to oest.	5	6	11
Control : Ovahormone (estradiol benzoil ester suspension) injection				
0.2 cc	2 times from dioest. to preoest.	6	4	10
0.3 cc	3 times from dioest. to preoest.	4	4	8
0.4 cc	2 times from preoest. to oest.	3	4	7
0.5 cc	2 times from preoest. to oest.	5	4	9

ある。15 時間まで観察したところでは排卵がみられず，24 時間後になると黄体の形成がみられた。排卵数は正常排卵の場合よりやや少なく，10 個体の観察では 1 回の排卵数平均 5.8 個，最高は 9 個，最少 2 個であった (Table 4)。ヒポホリンを投与したすべての個体から排卵があった。そしてヒポホリンの投与量と排卵数の間にはある程度関連があるように考えられる。すなわち，投与量の少ない個体では一方側の卵巣のみに排卵がみられた。また幼若ネズミでは排卵が行われたのちでも膈の開口はない。しかしこれらの人為的排卵によって得られた卵子も大きさや形態は正常卵子とほぼ同様であった (Fig. 7)。幼若卵巣においても卵子は完全に成熟しなければ排卵しないもののように思われる。

Table 4. Ovulation artificially induced by hypohorin (gonadotropic hormone) injection in juvenile rats.

Body weight of rats (gr)	Dose of hypohorin (rabbit unit)	Number of ovulated eggs		
		Left ovary	Right ovary	Total
45	5	2	5	7
45	5	3	3	6
45	5	4	3	7
45	10	4	3	7
50	3	3	2	5
50	3	2	3	5
50	2	0	3	3
50	2	2	0	2
60	5	5	2	7
60	5	5	4	9

3) 正常および人為的排卵による卵子の性状

上にのべた事実から，正常排卵と脳下垂体前葉ホルモンの刺激による排卵の間において，排卵過程にはなんら差異がみられず，また卵子そのものにもみとむべき差異は全くないことが確かめられた。

排卵された卵子は多数の濾胞細胞にかこまれて輸卵管を下降するため，この時期の卵子は位相差顕微鏡を用いても十分な観察はできない。このとき卵子のまわりに新鮮な精液またはヒアルロニダーゼ (hyaluronidase) 水溶液を滴下すると，濾胞細胞が分散しやがて卵子が明瞭に

Fig. 7. Fresh ovum from an immature rat, phase contrast. $\times 500$.

Fig. 8. By the application of sperm, most of follicle cells are dispersed: a few spermatozoa are observed near the egg surface, phase contrast. $\times 400$.

Figs. 9-10. Two successive stages in a fertilized ovum. Fresh material, phase contrast. $\times 300$. 9. A spermatozoa seen in a vicinity of the egg surface, with follicle cells in the process of dispersion. 10. Complete dispersion of follicle cells, showing the chorion elevated around the egg.

Figs. 11-12. Two successive stages in an immature egg taken from the ovary, fresh material, phase contrast. $\times 300$. 11. Before treatment: the ovum firmly surrounded by follicle cells. 12. Two hours after the application of the sperm: many spermatozoa are aggregating around the follicle cells, but there is no cell which shows dispersion.

Fig. 13. Irregular division of the second polar body, after the treatment of hyaluronidase. Fresh material, phase contrast. $\times 300$.

観察できるようになる (Chang & Hund 1956, Sato 1956, Yamane 1930) (Fig. 8-10)。しかしヒアルロニダーゼの量が多い場合には卵子の形態が不正になることも観察された (Fig. 13)。排卵前の未成熟卵子を卵巣組織内から取出して精子懸濁液を加えても濾胞細胞は強固に卵子に附着して分散せず，高濃度のヒアルロニダーゼを加えた場合のみ濾胞細胞の分散がみられた (Fig. 11-12)。すなわち排卵された卵子では濾胞細胞は精子の侵入で比較的簡単に分散するが，未成熟卵子では濾胞細胞の凝着が強固であるように思われる。

論 議

ハツカネズミやシロネズミにおける性週期は通常 4-5 日間を一週期としていることは古くから報告されている。この実験の結果からも同様のことがいわれる。排卵は発情期の後半に行われるのであるが，動物が衝動的な行動を示す時期は発情前期の後半から発情期の始めまでで，交尾はこの間に行われる。自然状態では，1 回に 4-9 個の排卵があり，多くの場合左右卵巣からの排卵数にかなりの差がみられた。これは卵巣の機能に交替性がある，主なる排卵は左右卵巣のいずれかが行い，次の排卵時にはその逆の関係になるもののように考えられている。排卵は発情期と併行して行われるものであるが，排卵現象そのものは脳下垂体前葉にある 2 種の性腺刺激ホルモンの作用によるものであって，内分泌学的には発情と排卵は一応別個の原因によるものと考えられている。幼若ネズミにおいて陰開口や発情が全くない状態でも脳下垂体前葉ホルモン投与で排卵が誘起されるのは恐らくこのためであろう。また成体に発情ホルモンを投与しても排卵に直接的变化を与えないのもそのためであろう。また発情期から発情間期に性腺刺激ホルモンを投与しても多数排卵のみられないのは卵巣においては黄体形成が行われているために，同時に濾胞の成熟や排卵が行われないためと考える。

この実験において人為的に排卵した卵子がいずれの場合にも正常の場合と同じ大きさを持ちまた十分に成熟していることが明らかになった。この事実から脳下垂体前葉ホルモンは単に排卵を誘起させる機能をもつばかりでなく，排卵の前提である濾胞の成熟，すなわち卵子を第二成熟分裂の中期の状態まで誘導する作用があるもののように考えられる。著者 (沖垣，未発表) は体外排卵実験の場合において，脳下垂体前葉が濾胞の破裂 (排卵) に与える影響よりも濾胞の成熟に対して，より強い作用があることを明らかにしたがその結果と考え合せて興味がある。体外培養溶液中では性腺刺激ホルモンによって卵子は十分成熟するが，濾胞を破裂させて排卵を起こさせるためには性腺刺激ホルモン以外の要素が必要であることが明らかになった (Nadamitsu 1957, Okigaki unpublished)。

人工的に排卵を誘起させる方法は種々行われているが，終局的には脳下垂体前葉の性腺刺激ホルモンの分泌を促進することにある。したがって人為的排卵には脳下垂体前葉の移植や脳下垂体前葉抽出物の投与が最もよいで十分な方法ではないかと考えられる。

幼若個体において排卵数が少ないのは卵巣の発達が不十分であって，排卵可能なまでに成熟した濾胞が少ないためとおもわれる。自然排卵においても初期には排卵数が少ないことも予想される。

未受精卵が輸卵管内で受精するときの細胞学的な変化については詳細な観察があるが，まず著しいのはコロナ細胞と濾胞細胞の分散である (Yamane 1930, Pincus & Enzmann 1932)。また卵子の成熟，第二極体の形成などの細胞学的観察は Gilchrist, Pincus (1932), Makino (1941) などにより詳細に行われている。最近では受精卵の位相差顕微鏡による生体観察 (Austin 1956a, b)，や受精卵の移植実験 (Briones & Beatty 1954, Chang & Marden 1954) などの研究が進んでいる。しかし体外における受精，ならびに受精卵の長期培養については報告がないが，困難ではあるが興味のある将来の研究課題である。

また実験に使用した cbbh 系シロネズミにおいて，多卵性濾胞 (Sigemoro 1947) を多く含

む個体と全く持たない個体とが観察された。これは遺伝的ななんらかの要素と関連した問題のようにも考えられ、将来の研究課題である。

要 約

シロネズミ (*Rattus norvegicus*) の正常排卵および性腺刺激ホルモンによる人為的排卵について観察した。

288 個体について観察した性週期は平均して発情前期 13.5 時間、発情期 25.3 時間、発情後期 13.3 時間、発情間期 56.5 時間で、総計して 1 週期は 108.7 時間 (約 4.5 日) である。排卵は発情期の後半に行われ、1 回の排卵数は 12 個体からの平均で 8.8 個である。

成体雌に 15-30 家兎単位のプロホリン (脳下垂体前葉製剤) を 2~3 回にわけて投与した 1 個体において、左右卵巣から合計 40 個の多数排卵をみた。投与時期は発情間期の後半から発情前期の間が好適と考えられる。発情期から発情間期にかけてはプロホリンは効果をもたないようである。

陰開口の行われていない幼若個体にプロホリン 2~10 家兎単位を投与すると、15~20 時間後に排卵が行われた。この場合、排卵数は自然排卵に比してやや少ない。

自然排卵の場合においても、人為的排卵の場合にあっても、排卵過程や卵子の形態には変化はない。細胞学的にも十分成熟しており、いずれの卵子も第二成熟分裂の中期にあった。性腺刺激ホルモンの作用は排卵を誘起するばかりでなく排卵前に濾胞の成熟を促進する機能をもっているようである。

Literature cited

- Allen, R.H. 1945. J. Exp. Zool. **90**: 159-161.
Austin, C.R. 1956a. J. Exp. Biol. **33**: 358-365.
Austin, C.R. 1956b. J. Roy. Micro. Soc. **75**: 141-151.
Braden, A.W.H. 1957. J. Exp. Biol. **34**: 177-188.
Briones, H. and Beatty, R.A. 1954. J. Exp. Biol. **125**: 99-118.
Browman, L.G. 1937. J. Exp. Biol. **15**: 375-388.
Chang, M.C. and Marden, W.G.R. 1954. J. Hered. **45**: 75-78.
——— and Hund, D.M. 1956. Exp. Cell Res. **11**: 497-499.
Gates, A.H. 1956. Nature **177**: 754-755.
Gilchlist, F. and Pincus, G. 1932. Anat. Rec. **54**: 275-288.
Green, J.A. 1956. Anat. Rec. **126**: 195-212.
Guthrie, M.J. and Jeffers, K.R. 1938. Anat. Rec. **12**: 11-36.
Hisaw, F.L. 1947. Physiol. Rev. **27**: 95-119.
Kirkham, W.B. and Burr, H.S. 1913. Am. J. Anat. **15**: 291-318.
Makino, S. 1941. J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. **67**: 305-380.
Mandel, A.M. 1951. Anat. Rec. **64**: 309-320.
Markey, J.A. and Hinsey, J.C. 1936. Anat. Rec. **64**: 309-320.
Nadamitsu, S. 1953. J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B **14**: 1-7.
——— 1957. J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B, **17**: 47-50.
Okigaki, T. 1958. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. IV, Zool. **14** (in press).
Pincus, G. 1940. Anat. Rec. **71**: 1-8.
——— and Enzmann, E.V. 1932. J. Exp. Biol. **99**: 403-408.
Sato, A. 1956. Miscell. Rep. Yamashina's Inst. Orithol. and Zool. **9**: 26-26.
Sigemoro, E. 1947. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. 6. **9**: 233-241.
Sobbotka, J. and Burckhard, G. 1910. Anat. Hefte. **42**: 433-498.
Yamane, J. 1930. Cytologia **1**: 394-403.