一 研 究 一

IVCS 系マウスにおける排卵ホルモン放出に関する研究

I. 下垂体摘出および Pentobarbital sodium 麻酔の影響

岡 本 道 生

(中外製薬株式会社総合研究所)

EVERETT¹⁻³⁾の報告のごとく午前5時点灯・午後7時消灯の照明時間調節を行なった飼育条件のものでは、ラットにおいて排卵ホルモン放出刺激時刻は proestrus (以下 P. と略) の日の午後2時から4時で、この時間すなわち “critical period” を Nembutal (以下 Nemb. で麻酔,あるいは atropine を投与すると estrus (以下 E.) の日の午前2時頃の排卵は抑制され、24 時間排卵の遅延が起こることは周知のとおりである。

ラットとはほぼ同様の腔垢像変化が観察され、正しく4日の性周期を回帰している IVCS 系マウス⁴⁾において、排卵時刻は E. の日の午前1時から4時^{5,6)} 全くラットと同一結果であった⁷⁾。このことから排卵ホルモン放出時刻もラットに準じるものと考え検討した。P. の日に経時的に下垂体摘出を行なって排卵の阻止効果を追跡した結果では、排卵に必要な量の下垂体ホルモン放出は P. の日の午後5時迄に起こるという結果が得られ、ラットとはほぼ同様の成績を示した。しかし Nemb. の単一投与の結果ラットのような24時間の排卵遅延はおこらず、短時間の排卵時刻遅延効果のみ観察された。すなわちラットとマウスでは LH サージ機構において差異のあることが示唆されるので、ここにその成績を報告する。

材料および方法

使用した IVCS 系マウスは 70~110 日令、体重 23~29 g のもので、腔垢像の観察により連続して2回以上正しい4日周期が確認された個体を用いた。

飼育環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 湿度 50~60% に設定された動物室で午前5時点灯・午後7時消灯の照明時間調節

A study of release of ovulating hormone in VICS strain mice. I. Delay in ovulation treated by Nembutal.

OKAMOTO, Michio T. (Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Toshima-ku, Tokyo 171)

Jap. J. Animal Reprod. 16 (2), 1970.

(14 L, 10 D) を行ない、アルミ製金網床ケージに木毛を入れて使用した。飼料は日本クレア製 CA-1 を用いた。

Nemb. (Abbott 製 pentobarbital 製剤: 50 mg/ml) の投与量はラットの場合は 30 mg/kg 腹腔内投与で排卵抑制効果が認められるが、本マウスの場合は 100 mg/kg 腹腔内投与で検討した。投与には 0.25 ml の注射筒を用い、投与後は動物の保温を特に留意し木毛で被った。atropine の場合は atropine の硫酸塩を生理食塩液で 250 mg/ml に溶解し、500 mg/kg 皮下投与した。

卵の検索は動物をエーテル屠殺後卵管を子宮および卵巣から分離し、生理食塩液を 1~2 滴滴下したスライドグラスにのせ、スライドグラスで挟んで顕微鏡下で観察した。

さらに本マウスの成績と対比的に検討するために成熟 Wistar-Imamichi rat⁸⁾ を使用した。飼育環境条件はマウスの場合と同様で、飼料は当研究所標準配合飼料を用いた。腔垢像による性周期の確認、卵の検索方法等はマウスの場合に準じて行なった。

下垂体摘出は今道の方法⁹⁾を改良し、エーテル麻酔下で行なった。下垂体摘出時刻は P. の日の午後の種々な時刻に行なったが、摘出時刻1時と記述してあるものは1~2 時、2時は2~3 時、4時は4~5 時の間に手術が完了していることを意味する。

成 績

1. 下垂体摘出の影響

P. の日の種々の時刻に下垂体摘出、Nemb. および atropine 投与を行ない、翌 E. の日の午前9時に剖検し、排卵抑制効果の検討を行なった。その成績は Fig. 1 に示した。

下垂体摘出による結果は午後1時からの手術の場合は全例卵が認められなかった。しかし午後4時からの手術では全例に卵が検出され、前述のごとく下垂体ホルモン

autopsy at 9.00 AM on the day of vaginal estrus treated on the day of proestrus.

Fig 1. Effect of hypophysectomy and single injected Nembutal, atropine on ovulation in IVCS strain mice.

autopsy and observed during the day of vaginal estrus

$$PM = \sqrt{\text{injected time}}$$

○ ○ ← injected dose

Fig 2. Changes of ovulating time by a single injection and additional injections of Nembutal in IVCS strain mice.

の排卵必要量は午後 5 時迄に放出されることが判明した。

2. Nemb. および atropine 単一投与の影響

次に Nemb. の投与を P. の日の午前 10 時, 正午, 午後 1 時, 2 時, 3 時, 4 時, さらに 6 時の 7 時刻で 100 mg/kg 宛腹腔内投与を行ない, 翌日午前 9 時に剖検したが, すべての投与時刻とも全例に排卵を認め, 全く抑制効果を示さなかった。投与を受けたマウスは仰臥姿勢にした状態を 3 時間以上保ち麻酔状態の持続が観察されているので, 明らかにラットの場合の Nemb. 投与による 24 時間の排卵遅延とは異なった成績を示していると考えられる。

そこでさらにラットで排卵抑制効果の報告されている atropine について検討した。すなわち P. の日の正午, 午後 1 時, 2 時, 3 時, 4 時, 5 時の 6 時刻に atropine を 500 mg/kg 皮下投与し, 翌朝 9 時に剖検した。その結果正午, 午後 1 時, 2 時, 3 時, 4 時の投与の場合は排卵抑制効果を示したが, 午後 5 時の投与では全く抑制効果を示さなかった。

以上の結果マウスにおいても排卵ホルモン放出には神経機構が関与していることが示唆されるので Nemb. 投与の影響についてさらに検討を加えた。

3. Nemb. 投与による排卵時刻遅延と追加投与の効果

自然周期の本マウスの排卵時刻は前述のごとく E. の日の午前 1 時～4 時である。そこで P. の日の午後 1 時に Nemb. 投与を行ない, E. の日の午前 4 時に剖検し卵の検索を行なった。その結果 50 mg/kg 投与群では全例排卵を認めたが, 100 mg/kg 投与群では 6 例中 2 例しか排卵しておらず, 排卵数も 4 コと 3 コであった。しかし午前 6 時の剖検の場合は全例排卵していた。この結果は Nemb. においても短時間ながら排卵時刻の遅延がおこったことを示している。そこで麻酔時間の延長を計るべく P. 日の午後 5 時に Nemb. の追注を行なった。100 mg/kg の追注を行なうとほとんどの動物が死亡してしまうので 50 mg/kg の追注を行なった。追注の結果午前 6 時では全例排卵していなかったが 2 時間後の 8 時には全例排卵しており, 追注によりさらに排卵の遅延時間の延長が認められた。しかしこの場合でもラットのような排卵の 24 時間遅延はひき起こされなかったわけである。そこで午後 5 時以後 2 時間間隔で Nemb. の反復追注を試みた。Fig 2. に示すごとく 7 時および 9 時までの追注の場合は 1 回の追注に伴ない大体 2 時間ずつの排卵時刻遅延が認められた。しかし午後 11 時までの追注を行なうとそれ以前の結果とは異なり, 排卵が連続的

Fig 3. Effects of Nembutal on gonadal and ovulating time in IVCS strain mice.

に遅延すると仮定したとき期待されていた午後 2 時に卵は検出されず、2 時以後 2 時間間隔で午後 10 時迄卵の検索を行なったが卵は検出されなかった。

さらに午前 1 時、3 時、5 時と追注の延長を行なった群の場合も同様の結果が得られた。すなわち P. の日の午後 11 時の追注迄行なうと翌日は排卵しないものと思われる。

P. の日の午後 11 時および E. の日の午前 1 時迄追注を継続した動物については、さらに次の日の午前 10 時 (Nemb. 投与開始後 45 時間) に剖検した結果 11 時まで追注を行なった群では 5 例中 3 例排卵しており、卵数はそれぞれ、12, 12, 13 コであった。また午前 1 時まで追注を行なった群は 7 例中 3 例排卵しており、卵数は 12, 12, 8 コであった。なお腔垢像は全動物とも腔垢的発情期像を示しており、P. E. E. の腔垢像周期が観察された。

以上の結果本マウスにおいてはラットのごとく排卵を 24 時間遅延させるには P. の日の午後 11 時迄 Nemb. の追注が必要ことが示された。また午後 9 時迄の追注では麻酔の持続時間と排卵時刻の遅延時間との間に平行関係が認められた。

これらの実験に用いた動物の剖検時の卵巢および子宮重量は Fig. 3 に図示した。すべての剖検時刻における卵巢、子宮ともに、自然周期の動物の排卵直前、直後の重量と大差なく、排卵時迄自然周期の排卵直前の重量を維持していたものと思われる。

なお先に排卵抑制効果を示したと記載した atropine

の場合も、P. の日の午後 1 時の投与で E. の日の午前 9 時には卵が検出されなかったが、午後 4 時に剖検した結果は全例排卵しており、Nemb. の場合と同様単一投与では排卵の 24 時間遅延はひきおこされることが判明した。

4. ラットにおける Nemb. 投与による排卵時刻の短時間遅延と追注の必要性について

次にラットの場合について Wistar-Imamichi rat を用いて検討した。自然周期における本ラットの排卵時刻は前述のマウスと同様である。P. の日の午後 1 時に Nemb. を 30 mg/kg 腹腔内投与を行なうと翌日は排卵せず、腔垢像周期は P. E. E. となる。2 日目の E. を示す日の午前 2 時の剖検では排卵していない動物が認められたが、午前 3 時では全例排卵しており、ほぼ正確な 24 時間の排卵時刻遅延が確かめられた。そこで P. の日午後 1 時に Nemb. を投与し、さらに翌 E. の日の critical period を再び阻止する目的で午後 1 時に再び投与した。すなわちこの場合は 48 時間の排卵時刻の遅延を期待したものであるが、その結果は翌朝午前 3 時には全例排卵していなかったが、以後 1 時間ごとに剖検を行ない午前 7 時の剖検では全例とも排卵していた。すなわち 1 日の排卵遅延をおこしたラットではマウスと同様に排卵遅延現象は必ずしも 24 時間単位で起こるものではなく、短時間の遅延が起こりうる可能性を示している。24 時間の排卵遅延後さらに 24 時間遅延を起こさせるには EVE-RETT らの報告のごとく E. の日の Nemb. 処置は Nemb. の単一投与では不十分で追注が必要であった。

⑤: sacrifice @: Nembutal 30 mg/kg @: Nembutal 10 mg/kg

Fig 4. Effect of Nembutal on ovulating time and a necessity of additional injection in Wistar-Imamichi strain rat.

考 察

元来マウスは性周期の不規則な動物とされて来たが、この IVCS 系マウスは陰垢像周期を中心として選抜により近親交配を行ない、規則正しく 4 日性周期を示すマウスとして育成改良を重ねて来たものである。従来繁殖生理面における基礎的検討がほとんどラットを用いてなされていた実情から脱皮し、研究面の一層の発展を望むためにも、本マウスの特性を細かく検討することの必要性を感じた。特にラットとの共通点並びに相違点の明確化により、ラットを用いての実験の際に生じた不都合な点、本マウスを用いて検討することにより幾分なりとも改善されることを今後の期待として本実験を企てた。

ラットでは 30 mg/kg の Nemb. 投与で排卵抑制効果が表示されるが、本マウスの場合この投与量では非常に麻酔時間が短く、100 mg/kg 投与を行なった。100 mg/kg の投与を行なうと投与後動物の保温に十分注意しないと死亡する個体がかかり出現するので、この投与量が腹腔内投与の可能量の限界に近いものと思われる。

本実験結果から IVCS 系マウスにおいては排卵有効量の下垂体ホルモン放出を伴う視床下部下垂体系の興奮は P. の日の午後 1 時から午後 11 時過ぎまでも起こりうるものと推定され、ラットに比べ極めて時間帯が長いものと思われる。

一方ラットの場合でも 24 時間の排卵遅延後再び 24 時間排卵遅延を成功させるには午後 1 時に Nemb. 30 mg/kg の投与 1 回のみでは不十分で、午後 5 時に追注が必要であり、追注を行なわないと正常排卵時刻から遅延した時刻に排卵するものと思われる。午後 5 時の投与のみでは排卵抑制は起こらない。これらの結果から P. の日に排卵ホルモン放出を抑制した場合は翌日排卵有効量のホルモン放出を起こす視床下部下垂体系の興奮の起こり得る時間帯は正常時より長くなるものと思われる。なお EVERETT らの報告では Nemb. の投与は午後 2 時ならびに 4 時となっており、本報告と異なるが 2 時および 4 時の投与の場合死亡例がかかり出現したので午後 1 時ならびに 5 時の投与とした。

一方 SCHWARTZ ら¹⁰⁾によると 5 日周期のラットの場合は LH の放出が 4 日周期の場合より長時間続き、さらに pentobarbital を午後 2 時に投与した場合 4 日周期の個体は排卵が抑制されるが、5 日周期の個体は抑制されないことを報告している。これらのことから 4 日周期のラットに対し P. の日の排卵ホルモン放出を抑制した場合の翌日の視床下部下垂体系の状態と 5 日周期のラッ

トの P. の日の状態、さらには IVCS 系マウスの P. の日の状態、これらの排卵ホルモン放出機構に類似性がうかがえる。

次に本マウスにおいて 24 時間の排卵遅延を起こすべく Nemb. の反復追注を午後 11 時および午前 1 時迄行なった群においては、午前 10 時の剖検で排卵していない個体が約半数例認められたことは前述のとおりである。しかしその翌日 (metestrus 像の現われた日) の午前中に卵管を検査した結果、前日に排卵したと思われる卵が全例に認められたことから、本マウスにおける Nemb. 追注による 24 時間の排卵遅延という言葉にはかなり時間的ずれが含まれているものと思われる。しかしラットの場合でも 48 時間の排卵遅延を試みた場合、午前 10 時ではやはり約半数例の個体しか排卵していなかった。したがってラットにおける 48 時間遅延の場合は本マウスの 24 時間遅延の場合と同様、排卵時刻のずれる傾向があるものと思われる。

さらに江藤¹¹⁾によるとラットにおいて Nemb. ですでに排卵を抑制し得ない時刻でも、下垂体摘出の場合にはなお相当の抑制が認められることを報告している。本マウスの場合午後 4 時に atropine 投与により排卵抑制を認めるにもかかわらず、4 時～5 時の下垂体摘出では全く抑制しなかった成績については、現在検討不十分で断定的には述べられないが、下垂体摘出術の完了と atropine 投与の効果発現との時間的な差によるものと思われる。このような成績から排卵ホルモンの急激な放出が午後 4 時頃に存在するものと思われ、今後は下垂体の排卵ホルモン含量の変化について検討したい。

終りに本実験に際し御指導、御助言を賜った東京大学農学部家畜生理学教室鈴木教授並びに当研究所信永技師に対し深く感謝致します。

(1970. 5. 27 受付)

文 献

- 1) EVERETT, J. W., C. H. SAWYER & J. E. MARKEE: *Enderinol.*, 44, 234, 1949.
- 2) EVERETT, J. W. & C. H. SAWYER: *Endocrinol.* 47, 198, 1950.
- 3) 江藤 (楨)・豊田 (裕)・星 (冬): 本誌, 3 113, 1958.
- 4) 信永 (利)・中村 (勝)・吉田 (幸): 本誌, 11, 7, 1965.
- 5) 信永 (利)・中村 (勝)・細谷 (妙): 本誌, 11, 16, 1965.
- 6) 信永 (利)・岡本 (道)・細谷 (妙): 実験動物, 16, 142, 1967.

- 7) 信永 (利)・中村 (勝)・小島 (操)・新谷 (参): 1955. 医歯薬出版.
本誌, 14, 8, 1968. 10) SCHWARTZ, N. B. & I. E. LAWTON: *Neuro-*
8) 今道 (友): 日本臨床, 19, 99, 1960. *endocrinol.* 3, 9, 1968.
9) 今道 (友): 脳下垂体, 伊藤 (四) 監修, 168, 11) 江藤 (禎): 本誌, 11, 35, 1965.

Summary

In IVCS strain mice with 4 day cycle, kept under the 14L, 10D lighting schedule (light phase from 5:00 am. to 7:00 pm.), the ovulation took place regularly on every 4 day in the period between 1:00 am. and 4:00 am. of the day of vaginal estrus. And the release of an enough quantity of ovulating hormone (LH) to cause ovulation occurred through the period from 1:00 pm. to 5:00 pm. on the day of vaginal proestrous. These data was quite comparable to the rats of Wistar-Imamichi strain under the same lighting schedule.

Although the rats showed the delay in ovulation for 24-hrs. by a single intraperitoneal injection of Nembutal (30 mg/kg) at 1:00 pm. of the proestrous day, the mice showed only a short delay (about 2 hrs.), but not 24-hrs-delay by the similar Nembutal treatment even with a much higher dosage (100 mg/kg). To extend duration of anesthetic state, additional injections of Nembutal (50 mg/kg/inj.) were performed at every 2 hrs., starting from 5:00 pm. of the proestrous day. In the mice given an additional injection at 5:00 pm., tubal ova were firstly found at 8:00 am. on the following morning. Until 9:00 pm. of the proestrous day when the last additional injection was made, with increase in numbers of additional injections, the delay in ovulation was proportionally prolonged for 2 hrs. per each injection. However, if the additional injections were extended to 11:00 pm. of the proestrous day or farther, the ovulation was completely blocked during the next day (the day of vaginal estrus), and showed 24-hrs-delay in ovulation.

A similar result was obtained with the atropine treatment. Namely, a single subcutaneous injection of atropine (500 mg/kg) at 1:00 pm. of the proestrous day resulted in ovulation for a several hrs. but not for 24 hrs.

It is assumed, therefore, that in the IVCS mice, a duration of the central excitation period, responsible for the LH-surge might last much longer than that in the rat.

A short delay in ovulation, however, was seemed to be present also in the rat under a certain condition. As was already pointed out by EVERETT *et al.* (1950), two successive injections of Nembutal at 1:00 pm. on the second day into the rat which had been blocked its ovulation in the first day, needed to get the delay in ovulation for 2 days. In the condition, when the supplemental injection at 5:00 pm. of the second day was omitted, the ovulation was delayed for about 3 hrs. from the proper time of ovulation.