過排卵処置マウスにおける着床卵子の発生学的変化

遠藤 克・石田 一夫・佐久間勇次

(日本大学医学部) (新潟大学農学部) (日本大学農獣医学部)

著者らはマウスの過剰排卵および過剰妊娠に関し、これまでに、PMS および HCG の投与量の検討³⁾、さらに、progesterone, prolactin の併用投与の効果について報告¹⁻⁵⁾してきた。その結果、マウスの過排卵に最も有効適切な PMS および HCG の投与方法を明らかにし、さらに、過排卵の卵子はそのほとんどが正常な分割像を示す受精卵子であるが、過排卵処置したマウスを交配させても不妊に終るものが多く、妊娠しても過剰分娩はほとんど認められないことを知った。そこで、過排卵処置後に progesterone を併用する試験を行なったが妊娠率・産子数の増加は認められなかった。しかし、過排卵処置後に prolactin を併用する試験を行ない、prolactin を併用する方法によって妊娠率が高くなり、また、過剰妊娠のマウスが多くなることを知った。即ち著者らは、過排卵処置したマウスに prolactin を併用して投与することによって卵子の着床条件が改善されることを知った。

今回は、過排卵処置によって排卵された卵子が着床期にどのような発生状態を示しているかということについて正常妊娠マウスの卵子と比較し、さらに、著者^{4,5)}らは過排卵処置マウスに対して prolactin の併用投与が卵子の着床に有効であると考えているので、prolactin を併用投与した場合どのような発生像を呈しているかを他の処置マウスと比較検討する目的で実験を行なった。その結果、若干の知見が得られたので報告する。

実験材料および方法

供試動物は、自家繁殖した CF #1 系の 1 経産マウス

Embryological changes of implanted eggs in superovulated mice.

ENDO, Tuyoshi, *Kazuo ISHIDA & **Yuji SAKUMA (Dept. of Public Health, School of Medicine, Nihon University, Tokyo 173; *Dept. of Animal Husbandry, Fac. of Agriculture, Niigata University, Niigata & **Dept. of Animal Physiology, College of Agriculture & Veterinary Medicine, Nihon University, Tokyo)

Jap. J. Animal Reprod. 16(3), 1971.

(体重 25~30g)である。マウスはアルミケージに 5 匹ずつ収容し、餌と水を充分に給与した。なお、飼育中の気温は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 5\%$ とし、照明時間は 14 時間照明とした。

実験は 4 区に分けて行なった。すなわち、I 区は正常妊娠マウス、II 区は過排卵処置マウス、III 区は過排卵処置に progesterone を併用したマウス、IV 区は過排卵処置に prolactin を併用したものである。

処置方法は過排卵処置として、PMS (Primantoron, Schering) 5 IU を皮下注射したのち、48 時間後に HCG (Primogonyl, Schering) 5 IU を皮下注射して雄と交配させた。併用区においては過排卵処置し交尾後 5 日目に progesterone (オオホルミン・ルテウム、帝臓) 1 mg を筋注、prolactin (プロラクチン、帝臓) 10 IU を皮下注射した。処置後、各試験区とも交尾後第 7 日目の午後 1 時 (受精後 180 時間) にと殺し、子宮を摘出して直ちに 10% ホルマリン緩衝液 (pH 7.0) に固定した。材料はそれぞれ数個に細分してセロイジンに包埋し、20 μ の連続切片を作製したのち hematoxylin 染色をほどこして永久標本を作り鏡検した。卵子の形態は GRAVES⁶⁾、ISHIDA⁷⁾ および平岩ら⁸⁾の報告を参考にして決定した。

実験結果

Plate A~D にみられるように、交尾後 7 日目において観察された卵子は後期胚盤胞、初期卵筒および卵筒であった。卵筒はさらに小型のものと大型のものとが区別された。初期の胚盤胞は内細胞塊と栄養膜からのみになっているが、後期の胚盤胞においては内細胞塊が外胚葉と内胚葉に分化している。これはまだ着床することなく、反子宮間膜側に楔状に突出した子宮腔内で子宮壁に接して存在している (Plate A)。卵筒の初期のものにおいては、外胚葉が胚外外胚葉と胚体外胚葉にわかれていた。胚体外胚葉は子宮間膜側に向かって突出し、すでに、担胚円錐体も形成されつつある (Plate B)。卵筒においては、原羊腔が子宮間膜部と反子宮間膜部にそれぞれ形成されているが、前者の腔は小さいので判然としない。これに対して、後者の腔は大きく、胚体外胚葉が層状に配列し

Table 1. Distribution of eggs at various developmental stages in the uterus of super-ovulated mice

Groups	Mouse No.		No. of egg	Stage of eggs			
				LB	EC	SC	C
I	1	L	5			1	4
		R	5				5
	2	L	2				2
		R	4				4
	3	L	3			1	2
		R	6				6
	4	L	5			1	4
		R	1				1
	5	L	6				6
		R	4				4
II	1	L	5				5
		R	4				4
	2	L	4		3		1
		R	2				2
	3	L	1				1
		R	0				0
	4	L	2			2	
		R	3			3	
	5	L	5	1	4		
		R	4		4		
	6	L	5				5
		R	6			1	5
III	1	L	6		2		4
		R	5				5
	2	L	6			6	
		R	6	1	1	4	
	3	L	15				15
		R	4				4
	4	L	14		5	2	7
		R	13		2	11	
IV	1	L	6				6
		R	4		1		3
	2	L	7			1	6
		R	3		1		2
	3	L	5			1	4
		R	5		1		4
	4	L	2		1	1	
		R	7		3	4	
	5	L	11			10	1
		R	10				10
	6	L	10				10
		R	12			2	10

L: Left uterus

R: Right uterus

LB: Later blastocyst

EC: Early egg cylinder

SC: Small egg cylinder

C: Egg cylinder

ているが、しかしながら、中胚葉の分化はまだ行なわれていない。すべての区を通じて、卵筒に小型のものと大型のものが観察されたが、形態的な相違はまったく認められない (Plate C, D)。

各試験区のマウスについて着床卵子の発生状態をまとめると、その成績は Table 1 に示す通りである。さらに、各試験区における後期胚盤胞、初期卵筒、小型卵筒および卵筒の出現頻度を示すと Table 2 および Fig. 2 の通りである。

I 区の正常妊娠マウス 5 例における着床卵子の発生状態は、41 個中小型卵筒が 3 個 (7%)、卵筒が 38 個 (93%) で、大部分の卵子は卵筒期にあった。II 区の過排卵処置マウス 6 例の卵子は、41 個中後期胚盤胞 1 個 (2%)、初期卵筒 11 個 (27%)、小型卵筒 6 個 (15%) および卵筒 23 個 (56%) であり、約半数が卵筒期にあった。No. 2 および No. 5 のマウスにあっては着床卵子の発生は他の個体にくらべて全体的に遅滞の傾向を示し、とくに、No. 5 のマウスにおいて著しかった。また、No. 3 のマウスの右側子宮には卵子の着床はまったく認められず、脱落膜の形成もきわめて不全であった (Plate E)。III 区の過排卵処置に progesterone を併用投与した 4 例においては、69 個中後期胚盤胞 1 個 (1%)、初期卵筒 10 個 (15%)、小型卵筒 23 個 (33%) および卵筒 35 個 (51%) であり、卵筒期にある着床卵子は正常妊娠マウスの約半数を示し、過排卵処置のみのものと比べると、小型卵筒と初期卵筒の割合が逆になっていることが認められた。No. 2 のマウスが他の個体に比べて卵子の発生が遅れており、未着床の後期胚盤胞が 1 個認められた (Plate A)。IV 区の過排卵処置に prolactin を併用投与した 6 例では、82 個中初期卵筒 7 個 (9%)、小型卵筒 19 個 (23%) および卵筒 56 個 (68%) であり、正常妊娠マウスと比べると、卵筒の割合が 25% ほど低いが、他の処置区のものに比べると 10% ほど高く、反面、初期卵筒の割合が低くなっている。本区においては、No. 4 のマウスのみ若干卵子発生の遅滞が観察された。一方、No. 2 のマウスの右側子宮卵巣近位に着床不全の卵筒期の卵子が 1 個発見された (Plate F)。

以上のように、過排卵処置をほどこした 3 区は、発生の遅滞した卵子の出現率が正常妊娠のものに比べて圧倒的に高いことが認められ、一方、処置区の間では、過排卵処置に prolactin を併用した区が他の 2 区に比較して発生の遅滞した卵子の出現は少なく良好であった。

着床卵子数と卵子遅滞との関係について検討したところ、Table 1 から推察されるように、着床卵子数が多い

Table 2. Proportion of later blastocyst, early egg cylinder, small egg cylinder and egg cylinder to total developmental eggs

Experiment groups	Developmental stages				Total
	Later blastocyst	Early egg cylinder	Small egg cylinder	Egg cylinder	
I	0 (0) %	0 (0)	3 (7)	38 (93)	41 (100)
II	1 (2)	11 (27)	6 (15)	23 (56)	41 (100)
III	1 (1)	10 (15)	23 (33)	35 (51)	69 (100)
IV	0 (0)	7 (9)	19 (23)	56 (68)	82 (100)

Fig. 1. Ratio of various developmental eggs.

子宮に発生が遅滞した卵子が多いという傾向は必ずしも認められなかった。

つぎに、発生遅滞卵子の子宮内における分布について観察したところ、Table 3 に示すような成績が得られた。遅滞卵子の多数出現した個体では、その分布が両側子宮全体にわたっているもの (Ⅱ区の No. 5, Ⅲ区の No. 2, Ⅳ区の No. 4)、いずれか一侧の子宮に偏っているもの (Ⅱ区の No. 2, Ⅲ区の No. 4, Ⅳ区の No. 5) などがみられる (Table 1)。発生遅滞卵子が少数しかみられないものでは、子宮の卵巣に近い部分または腔に近い部分に出現率が高く、両者を比較すると卵巣に近い部分において遅滞卵子の出現頻度が高く (45%), 腔に近い部分では低かった (25%)。

妊娠子宮における脱落膜の形成は、個体によって多少の差が認められたが、全般的にはおおむね良好であった。これに対して、着床のみられなかった子宮において

Table 3. Ratio of retarded eggs in the uterus

Experiment groups	Region near the ovary		Region near the uterus	
	No. of retarded eggs	No. of total eggs implanted	No. of retarded eggs	No. of total eggs implanted
I	3 (30) %	10 (100)	0 (0)	10 (100)
II	6 (60)	10 (100)	4 (40)	10 (100)
III	3 (38)	8 (100)	2 (25)	8 (100)
IV	6 (50)	12 (100)	4 (33)	12 (100)
Total	18 (45)	40 (100)	10 (25)	40 (100)

は、脱落膜の発達はいわめて不全であるか、あるいは、まったく反応がみられないものがあった(Ⅱ区の No. 3)。その状態は Table 1 と Plate E に示した。

考 察

過排卵処置によって排卵されたマウス卵子の初期発生に関する形態学的な研究は多数報告⁹⁻¹³⁾されている。大貫ら(1960)⁹⁾は、マウスに過排卵を誘起して、排卵から子宮に着床するまでの過程、とくに、排卵・受精および初期発生について細胞学的に観察した結果、総排卵数の約半分の卵子が受精し、正常な発生を続けながら卵管を下降し、2日目に桑実胚、3日目ないし4日目に胚盤胞に進み、この時期に子宮に着床することを報告している。また、佐藤(1959)¹¹⁾も、過排卵処置によって排卵された卵子の受精、着床および初期発生について観察し、1日目は2ないし4細胞期、2日目は桑実期、3日目には胚盤胞期にあり、時間的には自然排卵と同じく、正常な発生過程をたどることを報告し、さらに胚盤胞期に進んで着床した卵子は12日目まで正常に発生するが15日目以降急激に胎児が死亡すると述べている。

今回の実験において、著者らは過排卵処置によって排卵された卵子が着床期にどのような発生像を示しているか、とくに、過排卵処置に prolactin を併用^{4,5)}した場合にどうであるかについて、正常妊娠マウスの卵子と比較した。各試験区とも妊娠第7日目(受精後180時間)の卵子について詳細に観察したが、既報の成績とはことなっており、過排卵処置はマウスの着床時の卵子に微妙な変化を与えていることが明らかとなった。すなわち、正常妊娠マウスは大部分の卵子が卵筒であるのにもかかわらず、過排卵処置のみの区では、発生初期の卵筒が27%もあらわれ、処置マウスの卵発生が遅滞の傾向を示していることが認められた。また、過排卵処置後 progesterone を併用したマウスでは、卵筒が過排卵処置のみのものとほぼ同じ割合であったが、初期卵筒は15%を示しており、過排卵処置のみに比べると発生の遅れている卵子の割合がやや低く、やや改善されている傾向が感じられた。一方、過排卵処置後 prolactin を併用したマウスにおいては、初期卵筒が7%の出現率を示して過排卵処置区のなかで最も良好な成績であった。この事実は、過排卵処置マウスに prolactin の投与が有効であるという著者らの報告^{4,5)}を裏付けているものと考えられる。

卵子の着床数と発生の遅滞との関係について、今回の成績から判断すると、着床卵子数の多い子宮に卵子の発生遅滞が多く出現するという傾向は必ずしも認められな

かった。卵子の着床は子宮の許容量が限られているから、無制限というわけにはいかないが、着床期に子宮の状態が充分整っていれば、ある程度まで着床数の増加は可能なものと思われる。

発生遅滞卵子の出現部位を詳細に検討してみると、遅滞卵子が少数しかみられない個体では、子宮の卵巣に近い部位または腔に近い部位に出現する割合が多く、とくに、卵巣に近い部位に多かった。また、卵巣近位に、発生は正常であるが着床の不完全な卵子が発見された(Ⅳ区の No. 2 のマウス右側子宮)。このことは、これらの部位が卵子が着床し発生する環境としてはあまり良くないことを物語っているものと思われる。

この実験の結果、過排卵処置をほどこしたマウスは、着床期において、着床卵子の発生が正常妊娠マウスにくらべて遅滞することが明らかとなった。また、過排卵処置をほどこしたもののの中では、prolactin を併用投与したものが、遅滞卵子の出現が一番少なく、良好な成績であることが認められた。このことから、prolactin が卵子の発生遅滞防止に何らかの役割を果していることが想像されるが、prolactin の有効機序については、後日、あらためて検討したい。

要 約

過排卵処置マウスおよび過排卵処置後に progesterone または prolactin を併用投与したマウスについて、交尾後7日目の着床卵子を形態学的に観察し、正常妊娠マウスの卵子と比較したところ、つぎのような成績が得られた。

1) 交尾後7日目の卵子は、卵筒を示しているものが、正常な発生状態であったが、このほかに、後期胚盤胞、初期卵筒が出現した。また、卵筒には小型のものと大型のものが区別された。

2) 過排卵処置をした区はすべて発生遅滞卵子の出現率が正常妊娠のものに比べ圧倒的に高い傾向が認められた。処置区の間では、過排卵処置に prolactin を併用した区が発生遅滞卵子の出現率が低く、良好であった。

3) 着床卵子の多い子宮に遅滞卵子が多発する傾向は認められなかった。

4) 両側子宮、または片側子宮全体に遅滞卵子がみられるものがあった。しかしながら、遅滞卵子の出現は一般に子宮の卵巣に近い部位と腔に近い部位に多く、両者の間では前者に多く出現する傾向があった。

5) 着床卵子をもった子宮の脱落膜の発達はおおむね良好であった。一方、着床卵子のみられない子宮にあっ

ては、脱落膜の形成は不全であるか欠除していた。

(1970. 10. 9 受付)

文 献

- 1) 佐久間(勇)・遠藤(克)・石島(芳): 日農獣報 24, 7, 1967.
- 2) 佐久間(勇)・遠藤(克)・小島(昭)・石島(芳): 日農獣報 26, 9, 1968.
- 3) 佐久間(勇)・遠藤(克)・平野(公)・渡部(敏): 日畜関東支部会報 7, 20, 1968.
- 4) 佐久間(勇)・遠藤(克): 日不妊会誌 15, 1, 1970.
- 5) 佐久間(勇)・伊藤(雅)・遠藤(克): 日畜会報別号 81, 1970.
- 6) GRAVES, A.P.: *Am. J. Anat.* 77, 219, 1945.
- 7) ISHIDA, K: *Tohoku J. Agr. Res.* 6, 21, 1955.
- 8) 平岩(馨)・吉田(博)・内田(昭): シロネズミの発生・解剖・組織 第1版, 中山書店, 1960.
- 9) 大貫(泰)・佐藤(昌): 染色体 42, 43, 1421, 1960.
- 10) McLAREN, A. & D. MICHIE: *J. Exp. Biol.* 36, 40, 1959.
- 11) 佐藤(昌): 遺伝誌 34, 226, 1959.
- 12) 中村(紀): 染色体 44, 45, 1465, 1960.
- 13) GATES, A.: *Nature* 177, 754, 1956.

Summary

Embryological changes of implanted eggs in mice treated with superovulation treatment (S.O.), S.O.+progesterone, and S.O.+prolactin were observed using the mice on the 7th day after conception. The results obtained were as follows:

1) Normal developmental stage of implanted eggs was that of egg cylinder. Retarded eggs such as small egg cylinder, early egg cylinder and later blastocyst were also found all through the experimental groups.

2) The retarded eggs appeared more frequently in mice with S.O. treatment, as compared with naturally pregnant mice. Among treated mice, the mice treated with S.O.+prolactin showed the least number of retarded eggs, suggesting some good effect of prolactin on the egg development.

3) It was not necessarily confirmed that the more the implanted eggs, the more the retarded ones.

4) Retarded eggs were found either distributed in both uteri, or only in one of them. They were frequently found at the region near the ovary or near the vagina, more near the ovary than vagina.

5) Development of the decidual membrane in the implanted uterus was good on the whole. On the contrary, it hardly or not at all developed in the implantation-failing uterus.

PLATE

Explanation of the plate

Mouse eggs on the 7th day after conception. Pictures of the eggs were taken at the magnification of $\times 100$, and the picture of uterus at that of $\times 25$. Hematoxylin stain.

- A. Later blastocyst from No. 2 mouse. superovulation treatment (S. O.) + progesterone (Group III)
- B. Early egg cylinder from No. 2 mouse. S. O. + prolactin (Group IV)
- C. Small egg cylinder from No. 2 mouse. S. O. + prolactin (Group IV)
- D. Egg cylinder from No. 1 mouse. S. O. + prolactin (Group IV)
- E. Decidual reaction-poor uterus from No. 3 mouse. S. O. (Group II)
- F. Implantation-deficient egg cylinder from No. 2 mouse. S. O. + progesterone (Group III)