IVCS 系マウスにおける排卵ホルモン放出に関する研究

II. 4 日性周期における下垂体の排卵誘起力の変遷と

Metestrus の日の pentobarbital 麻酔に

よる排卵日の遅延について

岡 本 道 生

(中外製薬株式会社総合研究所)

規則正しく 4 日性周期を回帰している IVCS 系マウスの排卵時間は全ラットと同時間であり¹⁻³⁾、また排卵に必要な量の下垂体排卵ホルモンの放出時刻もラットとはほぼ同じ proestrus (以下 P.) の日の午後 5 時⁴⁾ である。そこでラットにおいて排卵抑制効果の報告されている pentobarbital (Nembutal, 以下 Nemb.) の投与^{5,6)} を本マウスに応用した結果、排卵の 24 時間遅延は午後 1 時の単一腹腔内投与では認められず、午後 5 時から 11 時迄の追注の反復が必要であった。午後 9 時迄の追注の反復で止めた場合には排卵時刻は正常時刻から追注の都度遅延を認めた。これらの成績は前報⁷⁾ で報告した。このように自然周期の排卵時刻からかなり遅れた時刻にも排卵が起こり得ることから、本マウスとラットでは排卵ホルモンの放出に差異があるのではないかと推測されるので、成熟マウスを用いた排卵誘起反応を指標として下垂体の gonadotrophin 含量の変遷について検討した。P. の日だけでなく他の stage の日における下垂体含量の変化についても検討し、4 日性周期を通した下垂体排卵ホルモン含量の変遷を観察した。

材料および方法

動物の飼育環境は前報と同様で、午前 5 時点灯、午後 7 時消灯 (14 L, 10 D) の照明時間調節を行なった。

排卵誘起力の測定に用いた IVCS 系マウスの下垂体は、腔垢像観察により連続して 2 回以上正しく 4 日周期を確認した 90~100 日令の個体を、所定の時刻に出来る

だけ速かにエール屠殺し、直ちに下垂体の採取、秤量を行ない、アセトン脱水乾燥処置後デシケーター中に保存した。

下垂体の排卵誘起力測定には乾燥下垂体を投与直前にメノウ乳鉢で粉砕し、生理食塩液にて懸濁溶解させ、生理食塩液 0.4ml 中に所定量の下垂体が含まれるように調整した。投与は規則正しく 4 日性周期を回帰している IVCS 系マウス (70~120 日令) に diestrus (以下 D.) の日の午後 4 時から 5 時の間に腹腔内へ行ない、20 時間後 (P. の日の正午から午後 1 時) に剖検し、卵管内卵の検索を行なった。排卵誘起力は投与された動物に対する排卵した動物の割合で求め、その成績から 50 % の動物に排卵を誘起させるのに必要と思われる下垂体量、すなわち 50 % 排卵誘起下垂体量を算出し、その 4 日性周期における変動を求めた。測定に際し下垂体は原則として 1 個ずつの単位で力価の測定を行ない、少なくとも各時刻とも 3 回以上行ない、全測定成績を集計した結果から力価の算出を行なった。

卵の検索方法、その他前報と同様である。

成績並びに結果

1. 下垂体の排卵誘起力の変遷

下垂体の採取は 4 日性周期の各 stage の日における午前 0 時、4 時、8 時、正午、午後 4 時、8 時と主として 4 時間間隔で行ない、その下垂体の排卵誘起力は前述の方法で測定した。各時刻の投与下垂体量および使用動物数、排卵した動物数、排卵率、排卵した動物の平均排卵数については Table 1 にまとめた。Table 1 の成績を図示すると Fig. 1~4 のごとくであり、この成績から 50 % 排卵誘起下垂体量を算出した。この 50 % 排卵誘起下垂体量の算出成績を 4 日性周期を通して図示すると Fig. 5 の通りである。

A study of release of ovulating hormone in IVCS strain mice. II. Changes of ovulating hormone content in the mouse pituitary during the 4-day estrous cycle, and delay in ovulation by anesthesia on the day of metestrus.

OKAMOTO, M. T. (Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co. Ltd., Toshima-ku, Tokyo 171). *Jap. J. Animal Reprod.*, 18 (1), 1972.

Table 1. Determinations of an ability to induce ovulation in the pituitary in adult IVCS strain mice during various phase of the 4-day estrous cycle

time dose*	diestrus						proestrus						vaginal estrus						metestrus					
	AM			PM			AM			PM			AM			PM			AM			PM		
	0	4	8	0	4	8	0	4	8	10	1	4	6	9	0	4	8	0	4	8	0	4	8	
1/16				0/2					0/4														0/3	
				0					0														0	
				(0)					(0)														(0)	
1/8	1/5	1/4	0/5	0/5	2/8	1/5	2/5	2/6	2/6	4/6	2/12	0/6	0/3		2/5	2/6	2/6	4/6	2/6	2/6	0/4	0/5	2/7	
	20	25	0	0	25	20	40	33.3	33.3	66.7	16.7	0	0		40	33.3	33.3	66.7	33.3	33.3	0	0	28.6	
	(4)	(1)	(0)	(0)	(2.5)	(1)	(7.5)	(2)	(2.5)	(6.5)	(2.5)	(0)	(0)		(7.5)	(2)	(2.5)	(6.5)	(4.5)	(1.5)	(0)	(0)	(6.5)	
1/4	5/6	4/5	5/6	4/5	4/7	6/7	3/4	5/5	5/5	6/6	6/7	6/8	1/5		3/4	5/5	5/5	6/6	6/7	6/8	1/5	2/6	4/5	
	83.3	80	83.3	80	57.1	85.7	75	100	100	100	85.7	75	20		75	100	100	100	100	100	20	33.3	33.3	
	(3.4)	(8.3)	(9.2)	(9.8)	(6.3)	(7.0)	(6.4)	(7.4)	(6.0)	(10.1)	(6.7)	(6.0)	(6)		(6.4)	(7.4)	(6.0)	(10.1)	(6.7)	(6.0)	(3)	(3.5)	(4.5)	
1/2	3/3	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	4/6	0/5				2/2	3/6	4/7	4/4	5/5	4/4	3/3	3/3	5/5	
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	66.7	0				33.3	50	57.1	100	100	100	100	100	100	
	(8.3)	(9.5)	(10.5)	(9.0)	(9.5)	(9.0)	(11.5)			(11.5)	(6.5)	(0)			(7.0)	(4.0)	(9.0)	(6.0)	(11.4)	(10.2)	(6.3)	(7.3)	(5.2)	
1															3/5	3/3	2/2	3/3	1/1					
															60	0	100	100	100					
															(4.3)	(0)	(7.0)	(7.0)	(10.3)	(10)				
2															1/1	4/4	1/1		ovulated animals	No. of animals				
															100	100	100		ovulated ratio					
															(10)	(10.2)	(14)		No. of ova/ovulated animals					

* dose: number(s) of pituitary gland(s)

Fig. 1, 2. Determinations of an ability to induce ovulation in the pituitary during diestrus and proestrus.

a. Diestrus の日

D. の日の午前 0 時における 50% 排卵誘起下垂体量は 1/5.4 個で、午前 4 時も同じ値で変化がなく、その後は午前 8 時、正午、午後 4 時と緩徐な下垂体力価の減少が続いた。午後 4 時の 50% 排卵誘起下垂体量は 1/4.5 個であった。午後 4 時以後は 8 時、P. の日の午前 0 時と下垂体力価の上昇が続いた。

b. Proestrus の日

午前 0 時の 50% 排卵誘起下垂体量は 1/6.2 個で、午前 4 時は 1/6.4 個、8 時も 1/6.4 個で、午前 0 以後 8 時迄ほとんど変化がなかった。しかし午前 10 時は 1/9.1 個となり急激な下垂体力価の上昇を認めた。この力価は周期を通して最高値であった。10 時以後は午後 1 時が 1/5.4 個、4 時が 1/4.8 個、6 時が 1/2.4 個、9 時が 1/1.1 個、さらに vaginal estrus (以下 E.) の日が 1.5 個となり、急激な、かつ極めて長時間にわたる下垂体力価の減少が続いた。

c. Vaginal estrus の日

E. の日の午前 0 時の下垂体力価は周期を通して最低値であった。午前 0 時以後は 4 時、8 時、正午、午後 4

Fig. 3, 4. Determinations of an ability to induce ovulation in the pituitary during vaginal estrus and metestrus.

時と顕著な下垂体力価の上昇が続き、午後 4 時の 50% 排卵誘起下垂体量は 1/2.9 個となった。午後 4 時以後は午後 8 時、metestrus (以下 M.) の日の午前 0 時と下垂体力価はほとんど変化しなかった。

d. Metestrus の日

M. の日の午前 0 時の 50% 排卵誘起下垂体量は 1/2.9 個で、午前 4 時には 1/3.2 個となりわずかながら下垂体力価の上昇を認めた。午前 4 時以後 8 時、正午と下垂体力価は全く変化せず同じ値が続いた。しかし午後 4 時になると 1/5.3 個となり急激な下垂体力価の上昇が認められた。午後 4 時以後は 8 時、D. の日の午前 0 時と顕著な変動は認められなかった。

以上のごとく下垂体の排卵ホルモン含量は自然周期の排卵を誘起する P. の日のホルモン放出の起こる前後の時期だけでなく、他の stage の日においても顕著な変動が観察された。

2. P. の日の午前 10 時からの Nembutal 投与による排卵抑制

前述のごとく下垂体の排卵ホルモン含量は P. の日の午前 10 時が最高で、午後 1 時ではすでに減少が認めら

Fig. 5. Changes of ovulating hormone content in pituitary during various phases of the 4-day estrous cycle in adult IVCS strain mice.

れたことから、前報⁷⁾の午後1時から Nemb. 麻酔を始めた場合の排卵抑制成績と午前10時から Nemb. 麻酔を始めた場合との比較検討を行なった。午前10時に Nemb. 100 mg/kg 腹腔内投与を行ない、午後2時以後2時間間隔で 50 mg/kg 腹腔内投与の追注を反復した。前報の午後1時から投与を開始し午後9時迄追注を行なった場合では、翌日の排卵時刻は自然周期の場合午前1時から4時であるのに対して正午にまで遅延した。しかしそれ以上の遅延は認められなかった。そこで今回行なった午前10時から投与実験では排卵が1日遅延するかどうかを翌日 (E. の日) の午後4時に剖検して判定した。その結果午後6時の追注を行なった群では全例排卵しており、8時の追注を行なった群では6例中2例が排卵していた。完全な排卵抑制は午後10時迄追注の反復が必要で、午後1時から投与を開始した場合とほぼ同じ結果となった。

3. M. の日の Nembutal 投与による排卵の1日遅延

4日性周期を通して下垂体の下垂体の排卵ホルモン含量の変遷を検討した結果、M. の日の正午から午後4時にかけて急激な増加を認めたことから、この急激な変動

を来すべく視床下部一下垂体系の興奮が M. の日の午後1時に存在するのではないかと推測した。もし (M. の日の午後1時に視床下部一下垂体系の興奮があるならば Nemb. 麻酔を行なうことにより性周期に対して何らかの影響が認められるであろうと考え、P. の日の Nemb. 麻酔の場合と同様に排卵日の遅延が起こるかどうかを指標として検討した。

まず正午に Nem. 100 mg/kg の腹腔内投与を行ない、午後4時以後2時間間隔で 50 mg/kg の腹腔内投与の追注反復を行なった。その結果8時迄の追注を行なった群は4例中2例、10時迄の追注を行なうと全例排卵日の1日遅延を認めた。次に午後2時に Nemb. 投与を開始し、午後8時迄の追注を行なった群では排卵日の遅延は認められず、10時迄の追注を行なった群でも7例中3例しか排卵日の1日遅延は認められなかった。これら排卵の1日遅延を認めた個体の腔垢像は M. M. D. P. E. M. という周期を示し、P. 像の出現が1日遅れる経過を認めた。

以上のごとく M. の日の正午に Nemb. 投与を開始し、P. の日の場合とほぼ同じ午後10時迄追注を行な

Table 2. Relationship between repetition of additional injections of pentobarbital on the proestrous stage and ovulating inhibition in the 4-day cyclic mice

Nembutal injection				No. of mice	ovulat.	ova/ovulated mice	uterine weight (mg)	ovarian weight (mg)
AM	PM							
10	2	4	6	6	+	11.0	95.6±9.8*	16.4±1.8
N	n	n	n					
AM	PM							
10	2	4	6	8	2	+	10.0	99.8(99.5~102.0)**
N	n	n	n	n	4	—	—	16.7(15.5~17.8)
							119.9±8.6	13.1±1.1
AM	PM							
10	2	8	6	8	10—6	—	—	133.8±7.3
								14.5±1.1

autopsy at 4 pm of vaginal estrus

Nembutal injected intraperitoneally, N: 100 mg/kg, n: 50 mg/kg

* ±S.D., ** (min.~max.)

Table 3. Effect of pentobarbital sodium injected at metestrous stage on occurrence of the ovulation in the adult 4-day cyclic mice

Nembutal injection				vaginal cycle	No. of mice	ova/No. of mice	uterine weight (mg)	ovarian weight (mg)
PM								
0	4	6	8	MD P E M	2	13.5	61.7(59.1~64.3)*	16.0(14.7~17.2)
N	n	n	n	↑ MMD P E M	2	11.5	75.0(74.0~76.0)	15.6(14.2~17.0)
				↑ MMD P E M				
PM								
0	4	6	8	10 MMD P E M	6	11.1	66.7±12.1**	15.9±2.8
N	n	n	n	↑ MMD P E M				
PM								
2	6	8		MD P E M	4	11.3	66.5±6.5	14.9±1.6
N	n	n		↑ MMD P E M				
PM								
2	6	8	10	MD P E M	4	10.0	67.5±6.3	16.1±1.3
N	n	n	n	↑ MMD P E M		9.0	65.5±(50.5~74.0)	14.2(11.1~16.8)
				↑ MMD P E M				

×: autopsy at 10 am of metestrus (M.)

↑: Nembutal injected intraperitoneally, N: 100 mg/kg, n: 50 mg/kg

* (min.~max.) ** ±S. D.

うと排卵の1日遅延を認めた。この結果 Nemb. 麻酔により排卵の1日遅延を引き起こすことは P. の日に限られたものでないことが明らかにされた。

考 察

ラットにおける報告では P. の日の午後に排卵ホルモンの放出があり、その結果下垂体の排卵ホルモン含量は

顕著に減少することが認められており⁸⁾、さらに下垂体の LH 含量は P. の日の午前中に最も多く、いわゆる“critical period”に減少を認め E. の日の午前中に最も少ない値を示すという報告がある⁹⁾。IVCS 系マウスにおける排卵に必要な量のホルモン放出時刻はラットとはほぼ同じ P. 日の午後5時であるが、その前後にはラットと同様下垂体の排卵ホルモン含量の顕著な変動が認めら

れるものと考えていた。今回の成績から本マウスにおける下垂体の排卵ホルモン含量は P. の日の午前 10 時を最高として、その後減少を認め E. の日の午前 0 時迄顕著な減少が続き、当初予測していたものよりその減少は大きく、しかも長時間であった。信永らによると本マウスにおける HCG の 50% 排卵誘起量は今回の測定と同じ D. の日の午後 4 時から 5 時迄の間の腹腔内投与で約 0.6 IU²⁾、また PMS の場合は 1.24 IU である¹⁰⁾と報告しており、下垂体の排卵ホルモン含量を HCG に換算すると P. の日の午前 10 時は約 5.4 IU、午後 4 時は約 2.9 IU、E. の日の午前 0 時は 0.4 IU となる。排卵に必要な量のホルモン放出時刻以後にも下垂体排卵ホルモン含量の顕著な減少が続くことから、おそらく排卵ホルモンの放出が続いているものと思われる。この排卵必要量のホルモンの放出された後にさらに引続いているホルモン放出は生理的に何の役割があるのか、その意義については現在なお不明である。

なお下垂体中および血中の FSH および LH の変動はほとんど同一時期であることが報告されている^{11,12)} ので、排卵ホルモンと表現されているものは LH が主体と考えられるが、FSH と LH の両者の混合調和されたもので、単独のホルモンでないことは明らかである。そこで今回測定した排卵誘起力を指標とした下垂体の gonadotrophin 含量の動きは各 gonadotrophin の調和された総合的な性腺に対する影響についてとらえられた変動と考えられるので、排卵に関する研究のためには有意義なものと思われる。

次に Nemb. 麻酔による排卵抑制は P. の日の午前 10 時に投与を開始した場合も、午後 1 時から開始した場合もほぼ同時刻迄の追注を必要とする結果となったが、この成績は排卵必要量のホルモン放出の時間だけの Nemb. 効果の持続では不十分で、排卵を 1 日遅延させるためには午後 11 時以後迄 Nemb. 効果を保持させる必要があることを示している。この結果をを自然周期の下垂体排卵ホルモン含量の変遷成績と合せてみると、ほぼ下垂体のホルモン含量が最低となる時刻以後迄の Nemb. 効果の持続がなければ排卵の 1 日遅延は引き起こされないことは明らかであり、下垂体排卵ホルモン含量の減少の続いている途中迄の Nemb. 効果の持続では覚醒後に排卵有効量のホルモン放出が起り得るという機構が窺える。このように自然周期における排卵必要量のホルモン放出のある時間帯の後に、麻酔から覚醒した場合排卵有効量のホルモン放出を起し得る時間帯が続き、これら二つの時間帯が Nemb. 効果の持続性を高

めることにより完全におおわれた時に始めて排卵の 1 日遅延が引き起こされるものと思われる。

一方ラットにおいて排卵の 1 日遅延を引き起こすには P. の日の午後 1 時の Nemb. 30 mg/kg 腹腔内単一投与で可能であり、追注の反復を必要とする本マウスと相違がある。この点については次のことが考えられる。すなわちラットにおいてはマウスに比べ Nemb. 麻酔の覚醒が非常にゆるやかで、麻酔が長時間にわたって持続される。あるいは排卵ホルモンの放出時間がマウスに比較して短時間である等の事柄が考えられる。実際ラットに P. の日の午後 1 時に Nemb. を 30 mg/kg 腹腔内投与をした場合、午後 5 時頃復返り等の動作を認め、麻酔度が浅くなったことが察知される。しかしどの程度にまで麻酔が覚めると排卵ホルモン放出の抑制が解けるのか、この点は不明確である。また排卵ホルモンの放出時間についてもマウスの場合のように排卵に必要な量の放出後もホルモン放出が続いているかどうか、この点に関しても明らかでないので、本マウスとラットとの相違点に関しては今後さらに検討の必要がある。

4 日性周期を通した下垂体の排卵ホルモン含量の変遷を観察した結果、P. の日のほか、特に M. の日においては正午から午後 4 時にかけて急激な下垂体含量の増加を認めたが、さらに E. の日、D. の日においても正午から午後 4 時にかけて下垂体の排卵ホルモン含量の変動が必ず観察された。この結果視床下部一下垂体系の何らかの興奮がいわゆる P. の日の“critical period”に相当する時間帯において毎日存在するのではないかと考えられる。M. の日の場合 P. の日の排卵抑制を引き起こす Nemb. 投与とはほぼ同じ午後 10 時迄の追注の反復は、排卵の 1 日遅延が引き起こされ、P. の日の視床下部一下垂体系の状況と類似が窺え興味深い。ラットにおいても M. の日¹³⁾、さらに D. の日における Nemb. 麻酔により排卵の 1 日遅延が認められた^{14,15)}。このように下垂体の排卵ホルモン含量の変動する時間帯に対する Nemb. 麻酔は排卵日の遅延が引き起こされたことから、これら下垂体含量の変動は性周期の機序の上から大切な要因の一つと考えられる。

終りに本実験に際しご指導、ご助言を賜った東京大学農学部家畜生理学教室の鈴木教授並びに当研究所の信永博士に対し深謝する。 (1972. 1.14. 受付)

文 献

- 1) 信永(利)・中村(勝)・細谷(妙): 本誌, 11, 16,

- 1965.
- 2) 信永(利)・岡本(道)・細谷(妙): 実験動物, **16**, 142, 1967.
 - 3) 信永(利)・中村(勝)・小島(操)・新谷(参): 本誌, **14**, 8, 1968.
 - 4) 岡本(道): 日猷会誌, **31**, 学会号, 77, 1969.
 - 5) EVERETT, J. W. & C. H. SAWYER: *Endocrinol.*, **47**, 198, 1950.
 - 6) 江藤(禎)・豊田(裕)・星 (冬): 本誌, **3**, 113, 1958.
 - 7) 岡本(道): 本誌, **16**, 52, 1970.
 - 8) 江藤(禎)・豊田(裕)・星 (冬): 本誌, **4**, 83, 1958.
 - 19) SCHWARTZ, N. B. & E. BARTOSIK: *Endocrinol.*, **71**, 756, 1961.
 - 10) 信永(利)・高橋(和): 本誌, **13**, 19, 1967.
 - 11) GORDMAN, B. D. & V. B. MAHESH: *Endocrinol.*, **83**, 97, 1968.
 - 12) MCCLINTOCK, J. A. & N. B. SCHWARTZ: *Endocrinol.*, **83**, 433, 1968.
 - 13) 岡本(道)・信永(利): 日猷会誌, **31**, 学会号, 220, 1969.
 - 14) BROWN-GRANT K.: *J. Endocrinol.*, **43**, 539, 1969.
 - 15) OKAMOTO, M. T., T. NOBUNAGA & Y. SUZUKI: *Endocrinol. Japon.*, **19**, 11, 1972.

Summary

The ovulating hormone (O. H.) content in the mouse pituitary was determined throughout the normal 4-day estrous cycle, bioassayed by the extra-ovulation inducing potency. The preovulatory decrease of O. H. onset soon after 10 am of the day of proestrus from the maximal level in the cycle, and continued through 1 pm, 4 pm, 6 pm, 9 pm, and finally the content of O. H. reached to the minimal level at 0 am of the day of vaginal estrus. It is revealed that the release of O. H. is continued further even after the period, 5 pm of the day of proestrus, when the enough quantity of O. H. to cause ovulation has already been released.

Since the onset of decrease of pituitary potency was observed at 10 am, the injections of pentobarbital (Nembutal) was started at 10 am of the day of proestrus for the blockade of ovulation. Although the single injection was not effective, the repetition of additional injections for every 2 hrs. until 10 pm was attained the blockade of ovulation in all animals. This is also the case where the injection is started at 1 pm. These results may indicate that pentobarbital anesthesia which covers all over the term of preovulatory O. H. decrease in the pituitary, is able to delay the periodical ovulation by 24-hrs.

A sudden increase of pituitary O. H. content was observed from noon to 4 pm of the day of metestrus. By this increase the content of O. H. attained to a level of the early morning of proestrus. Repeated injections of Nembutal for every 2 hrs. from noon to 10 pm on the day of metestrus also caused a delay in ovulation by one day together with a delay in appearance of the vaginal smear of proestrus.

In the period from noon to 4 pm of the days of estrus and diestrus, an appreciable change in O. H. content of the pituitary was observed.

It is noteworthy that the time of fluctuation of O. H. content in pituitary was found every day around the time corresponding to the so-called "critical period" in the day of proestrus.