

成熟ラットにおける PMSG 投与後の大型卵胞の消長ならびに 過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタールの影響

利 部 聰

(山口大学農学部)

成熟ラットから、より多くの卵を得るために通常 PMSG と hCG を用いた過排卵処理が行なわれているが、同処理で得ることのできる排卵数の最高は現在のところ 50 個程度であることが報告されている¹⁾。著者らは発情後期に各種用量の PMSG を単一投与し、その後の正常卵胞数の推移を発情前期予定日まで形態学的に検索し、排卵に至る大型卵胞 (直径 550 μm 以上) は発情前期予定日まで増加することを報告した²⁾。このようなラットでは発情期予定日には自然排卵が抑制されることが知られているが³⁾、排卵が抑制された後の卵胞の推移については不明である。本実験ではこの点を明らかにするために前報²⁾においては検索しなかった発情期予定日以降の卵巣を形態学的に検索した。また発情前期予定日にペントバルビタールを投与して排卵数におよぼす影響を調べた。

材料および方法

実験 1: PMSG 投与後の大型卵胞 (直径 550 μm 以上) 数の消長

実験には Wistar-Imamichi 系のラットを使用し、人工昼夜 (09:00~23:00 時点灯) 下で飼育した生後 12~14 週で正常な 4 日型発情周期を 2 回以上繰返した健康なものを供試した。

PMSG (セロトロピン, 帝国臓器製薬製) は 40 IU が 0.2 ml 中に含まれるように生理食塩液で調整したものを、40 IU を発情後期の 13:00 時に内股部筋肉内に注射した。

PMSG 投与ラット, 対照の生理食塩液 0.2 ml 注射ラットとも各 30 頭を 6 群に分け、排卵予定時刻前 12 時間 (-12 h), 同 6 時間 (-6 h), 排卵予定時刻 (0 h),

排卵予定時刻後 12 時間 (+12 h), 同 18 時間 (+18 h), 同 24 時間 (+24 h) に頸動静脈全放血によって 5 頭ずつ屠殺した。なお、本実験で使用したラットの排卵予定時刻は、発情期の 07:00 時である。屠殺後ただちに卵巣を摘出し、ラウドウスキー液で 1 昼夜固定した後パラフィン包埋し、15 μm の連続切片にしてハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色を行ない、卵胞の直径が 550 μm 以上の正常卵胞を数えた。卵胞の大きさの測定は前報²⁾と同様に行ない、正常卵胞と閉鎖卵胞の区分は BRAW & TSAFRIRI⁴⁾ の方法に準拠した。すなわち、正常卵胞 (非閉鎖卵胞) とは、顆粒層細胞に核濃縮および黄体細胞化が認められず、卵胞腔中に細胞屑ならびに大食細胞が存在しないものである。また排卵の有無、排卵数の観察は、卵管を子宮とともに摘出し生理食塩液でかん流して行ない、採卵数の合計を採卵数とみなした。

実験 2: PMSG 投与ラットにおける hCG 投与時期と排卵数の関係

実験 1 と同様に、PMSG 40 IU を発情後期の 13:00 時に内股部筋肉内に注射後、hCG (ゴナトロピン, 帝国臓器製薬製) 40 IU を -12h, 0h, +12h に筋肉内注射し、20 時間後に屠殺して排卵数を観察した。hCG は 40 IU が 0.2 ml 中に含まれるように生理食塩液で調整した。

実験 3: 過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタールの影響

PMSG 40 IU を発情後期の 13:00 時に注射し、51 時間後に 4 mg/100 g B.W. のペントバルビタール・ソディウム (ネプタール, アポットラボラトリー製, PB) を腹腔内注射した。PB 注射 27 時間後に hCG 40 IU を注射し、hCG 注射 20 時間後に屠殺して排卵数を検索した。対照群としては、1) PB および hCG のかわりに 0.2 ml の生理食塩液を注射した群、2) PB のかわりに 0.2 ml の生理食塩液を注射し、27 時間後に hCG を投与した群、3) PMSG 投与 1 時間後に PB のみを注射した群、4) PMSG および PB 投与後、hCG のかわりに 0.2 ml の生理食塩液を注射した群をあてた。1), 2), 4) は hCG 注射 20 時間後に相当する時期、3) は PB 注

Follicular response of adult rats to PMSG and effect of sodium pentobarbital on number of ova shed in superovulation treated rats.

KAGABU, SATOSHI (Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753)

Japan. J. Anim. Reprod., 29(1), 1983.

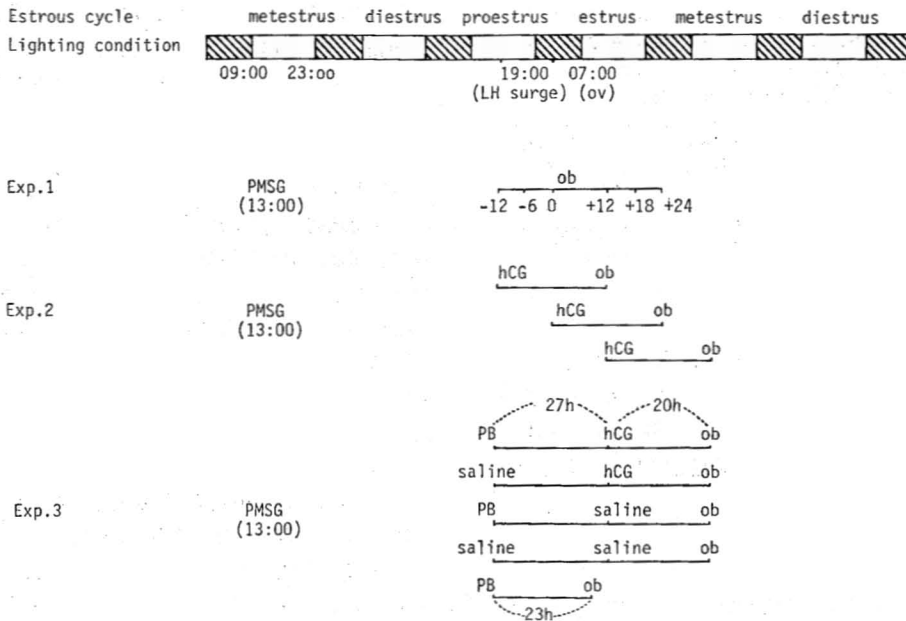


Fig. 1. Experimental schedules. Forty IU PMSG or 40 IU hCG were injected im. Hatched columns represent dark period and open columns represent light period. Ov: Estimated time of ovulation in untreated rats. PB: Injection of sodium pentobarbital (4 mg/100g B.W.). Ob: Observation.

射 23 時間後に屠殺して排卵数を検索した。なお、本実験に用いたラットの“critical period”は、14:00~16:30 時である。

実験成績の有意差検定は F 検定による。

結 果

実験 1: 結果は表 1 に示した。

PMSG 投与群の直径 550 μm 以上の正常卵胞数は、すべての観察時期において対照群より多く ($P < 0.05 \sim 0.01$), +12h まで増加し、+18h 以降は急激に減少した。排卵が認められたラットは、+18h と +24h にそれぞれ 1 例で、対照群は 0h 以降全例に認められた。

実験 2: 結果は表 2 に示した。

PMSG 投与ラットの排卵数は、-12h に hCG を投与した群で最も多い傾向を示したが、0 および +12h との間で有意差は認められなかった。

実験 3: 結果は表 3 に示した。

PMSG 投与後、550 μm 以上の正常卵胞数が最高値に達した時期に hCG を投与しても排卵数が増加しないので、卵胞の排卵能を維持する目的でペントバルビタールを投与しその影響を調べた。

PB 投与後に hCG を投与した過排卵処理ラットの排

Table 1. Effect of 40 IU PMSG on ovarian follicular development in adult cyclic rats (Values are mean ± SEM)

Time of observation	Treatment*	No. of follicles (≥550 μm in diameter)	Rats ovulating/ rats examined	No. of ova/ovulated rat
-12h	Saline	16.8 ± 0.7	0/5	—
	PMSG	47.8 ± 4.6	0/5	—
-6h	Saline	17.0 ± 0.5	0/5	—
	PMSG	43.6 ± 4.9	0/5	—
0h	Saline	4.4 ± 0.4	5/5	10.2 ± 1.3
	PMSG	56.0 ± 5.3	0/5	—
+12h	Saline	2.8 ± 0.4	5/5	14.2 ± 0.9
	PMSG	110.0 ± 7.3	0/5	—
+18h	Saline	1.9 ± 0.3	5/5	14.2 ± 0.7
	PMSG	68.3 ± 10.6	1/5	1
+24h	Saline	1.4 ± 0.5	5/5	14.4 ± 1.3
	PMSG	35.0 ± 3.4	1/5	2

* PMSG or saline were injected at 13:00h on the day of metestrus.

卵数は 99.8 で、PB を投与しない同処理群の 20.6 より有意に多かった ($P < 0.01$)。

さらに、PMSG 投与後 PB および hCG を投与しな

Table 2. Effect of 40IU hCG injection on the induction of ovulation in adult cyclic rats pre-treated with 40IU PMSG at 13:00h on the day of metestrus (Values are mean±SEM)

Time* of hCG injection	Rats ovulating/ rats examined	No. of ova/ ovulating rat
-12h	5/5	42.2± 4.8
0h	4/5	35.6±10.1
+12h	4/5	23.2± 9.9

* See Fig. 1.

い対照群ならびに PB を投与し hCG を投与しない対照群では排卵はそれぞれ 1 例のラットに認められ、排卵数は 1 および 2 であった。また、PMSG 投与後 PB を投与し、23 時間後に観察した対照群においても排卵が認められなかった。

考 察

直径 550 μm 以上の正常卵胞数は、+12h に最高値を示しその後減少した。未成熟ラットにおいて、PMSG に反応して発育した直径 500~600 μm の大型卵胞のチミジン取込みは、PMSG 投与後 72 時間で最大となった後減少することが知られており、成熟ラットでの本実験の成績もこのような理由によるものと推測される。

ラットにおいて、排卵に至る卵胞の大きさはほぼ 550 μm 以上と考えられている^{2,8-8)}。従来の過排卵処理法⁹⁾における hCG の注射時期は -12h であるが、550 μm 以上の正常卵胞数は +12h で最大値に達するので、この時期に hCG を投与すればより多くの卵が得られるであろうとの予測にたつて実験 2 を行なった。しかし、従来どおりの -12h に hCG を投与した群より増加しなかった。これは +12h での 550 μm 以上の正常卵胞の多くは、形態的に正常であっても機能的には hCG に反

応せず排卵に至らなかったためであろうと推察された。この原因は、PMSG により卵胞を発育したラットにおいても発情前期の午後に LH の上昇があると仮定すれば、RICHARDS ら¹⁰⁾が指摘しているように、LH によって卵胞の LH レセプターが減少し、hCG に対する反応性が低下したためではないかと考えることができる。この仮説を証明する目的で実験 3 では PMSG 投与ラットの発情前期に PB 投与を試みた。PMSG 投与により LH サージが早まるとの指摘¹¹⁾や、“critical period”を変化させないとの報告¹²⁾もあり詳細は明らかではない。予備実験において PMSG 投与ラットに PB の注射時期を変えて投与すると 09:00~21:00 時の間では 16:00 時が最高値となった(利部, 未発表)ので、本実験では PB 投与を 16:00 時とした。その結果、PMSG, PB, hCG 投与後の排卵数は約 100 個となり従来の 2 倍に増加した。

PMSG 10~35 IU を発情後期に投与したラットの LH は正常値以下だが存在すると推測した報告¹³⁾や、PMSG 50 IU を発情後期に投与したラットでは LH サージがほとんど認められないとの報告¹⁴⁾、また PB¹⁵⁾やフェノバルビタール¹⁶⁾は卵巣の Estradiol-17β や progesterone, progrenolone の生成に影響するとの研究もあり、PB の過排卵処理ラットの排卵数増加の機序の詳細は不明であり、機序の解明は今後の問題として残された。

要 約

成熟ラットを用い、PMSG 注射後の直径 550 μm 以上の正常卵胞数の推移を調べ、同卵胞数が最高値に達した時期に hCG を注射し、排卵数を観察した。また、発情前期におけるペントバルビタール投与の排卵数におよぼす影響もあわせ検索した。

1. 発情後期に PMSG 40 IU 投与後、直径 550 μm 以上の正常卵胞数は排卵予定時刻後 12 時間 (+12h)

Table 3. Effect of sodium pentobarbital on the number of ova in adult cyclic rats pre-treated with 40 IU PMSG (Values are mean±SEM)

Metestrus	Treatment*		Rats ovulating/ rats examined	No. of rats	
	Day of proestrus	Estrus		23 h after pento-barbital injection	20 h after hCG or saline injection
1) PMSG	Pentobarbital	Saline	1/5	—	1
2) PMSG	Saline	hCG	5/5	—	20.6± 9.1
3) PMSG	Pentobarbital	—	0/5	0	—
4) PMSG	Pentobarbital	Saline	1/5	—	2
5) PMSG	Pentobarbital	hCG	5/5	—	99.8±11.4

* See Fig. 1.

に最高値(約110個)に達し、以後急激に減少した。

2. 大型正常卵胞数が最高値に達する +12h に hCG (40 IU) を筋肉内注射し、排卵数を検索したが排卵数の増加は認められなかった。

PMSG 投与後、発情前期にペントバルビタールで麻醉し、+12h に hCG を投与した結果、排卵数は約100個と著しく増加した。

(1982. 6. 23 受付)

文 献

- 1) 石橋(功)・青木(ひ): 本誌, 21, 130, 1976.
- 2) 利部(聰)・石橋(功): 本誌, 28, 1, 1982.
- 3) 石橋(功)・利部(聰)・黒鳥(英): 本誌, 25, 31, 1979.
- 4) BRAW, R. H. & A. TSAFRIRI: *J. Reprod. Fertil.*, 59, 267, 1980.
- 5) PELUSO, J. J. & R. W. STEGER: *J. Reprod. Fertil.*, 54, 275, 1978.
- 6) MANDL, A. & S. ZUCKERMAN: *J. Endocr.*, 8, 341, 1952.
- 7) 橋爪(一)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 21, 28, 1975.
- 8) 橋爪(一)・菅原(七)・竹内(三)・正木(淳): 本誌, 23, 148, 1977.
- 9) 石橋(功): 本誌, 12, 127, 1967.
- 10) RICHARDS, J. S., J. J. IRELAND, M. C. RAO, G. A. BERNATH, A. R. MIDGLEY, JR. & L. E. REICHERT, JR.: *Endocrinology*, 99, 1562, 1976.
- 11) GEGENBACK, D. R., N. BUTENDIECK, P. M. RIEK, R. L. SCIPIONI, E. B. OLTENACU & R. H. FOOTE: *J. Anim. Sci.*, 46, 1293, 1978.
- 12) GEIGER, J. M. & D. CHATEAU: *C.R.C. Soc. Biol.*, 170, 464, 1976.
- 13) WELSCHEN, R. & M. RUTTE: *Acta endocr.*, 68, 41, 1971.
- 14) 鮫島(秀)・江藤(禎)・笹本(修)・田谷(一): 第91回日本獣医学会講演要旨集, 41, 1981.
- 15) BUTCHER, R. L., W. E. COLLINS & N. W. FUGO: *Endocrinology*, 96, 576, 1974.
- 16) MEYER, R. K., H. J. KARVALOS, M. KLAUSING & D. W. NORGARD: *Endocrinology*, 88, 983, 1971.

Summary

The development of ovarian follicles in adult rats and effect of sodium pentobarbital on the ability of antral follicles to ovulate response to hCG were examined.

Experiment 1: Ovarian follicular development: In rats treated with 40 IU PMSG at 13:00 h on the day of metestrus, the number of follicles ($\geq 550 \mu\text{m}$ in diameter) showed a peak (about 110 follicles per both ovaries) on the day of expected estrus.

Experiment 2: Effect of hCG in PMSG treated rats: When 40 IU hCG was injected on the day of estrus in PMSG treated rats, the number of ova shed did not increase.

Experiment 3: Effect of sodium pentobarbital: Sodium pentobarbital was injected ip 51 h after PMSG treatment. Then 40 IU hCG was injected 27 h after the injection of sodium pentobarbital. The number of ova shed increased about 100 ova per both ovaries at 20 h after hCG injection.

These results suggest that sodium pentobarbital is effective to maintain the ability of antral follicles to ovulate at least until the day of expected estrus in PMSG treated adult rats.