



Title	エストロゲン処理家兔の膣からの受精卵採取とその生存性の証明
Author(s)	武田, 哲男; 山本, 謙二; 田辺, 泰博; 堤, 義雄
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 10(3), 231-240
Issue Date	1977-05-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11894
Type	bulletin (article)
File Information	10(3)_p231-240.pdf



[Instructions for use](#)

エストロジェン処理家兎の膣からの受精卵 採取とその生存性の証明

武田 哲男・山本 謙二
田辺 泰博・堤 義雄
(北海道大学農学部畜産学教室)
(昭和51年6月17日受理)

Collection of fertilized eggs from the vagina in estrogen treated rabbits and viability of the eggs

Tetsuo TAKEDA, Kenji YAMAMOTO, Yasuhiro TANABE
and Yoshio TSUTSUMI
(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)
Received June 17, 1976

緒 言

正常な家兎では通常交配後10時間で排卵し、卵子が卵管膨大部と峡部の結合部に到達するのに12~14分を要するが^{10,27,29)}、この結合部周辺に約36時間とどまる^{24,30,31)}。卵管から子宮内への進入は交配後72~90時間で、卵子は初期胚盤胞にまで発育している¹¹⁾。この卵子移送は卵管の繊毛や平滑筋の活動、および卵管子宮結合部の機構と関連し²⁴⁾、これらの生理的活動は排卵後の卵巣ホルモンの均衡に依存する。卵巣除去^{1,18,35)}やエストロジェン投与により、卵管内の卵子移送が変化し^{4,5,13~17,20,22,26,37,41)}、エストロジェンの投与量や投与時期によっても、卵子移送が促進されたり^{4,20,22,24,26,28,41)}、逆に卵管内に長時間滞留したりする^{13,15,20,24,26,37)}。

また、エストロジェンを処理した交配家兎の生殖道内から回収された卵子数が少ないことから、未回収の卵子は既に膣内に排出されているものと推測されている^{20,22,35)}。しかし、実際にエストロジェン処理後の膣内に卵子を発見した報告には、わずかに CHANG^{14,15)}、CHANG and HARPER¹⁶⁾、CHANG and YANAGIMACHI¹⁷⁾らの各種のエストロジェンを経口投与して、交配後2日目から6日目に屠殺し、膣内に排卵数の2%前後の卵子を確認したものがあつたにすぎない。一方、GREENWALD²²⁾の実験では交配後8日目の卵管および子宮からの卵子回収率はわずか18%にとどまり、残り82%は子宮外へ排

出されたものと推論しており両者間に大きな相違が認められる。

本研究ではエストロジェン処理家兎の膣内に排出されていると思われる受精卵の膣洗滌による採取を試みて、非手術的な受精卵の回収に成功したのみならず(実験1)、さらにそれら卵子の生存性を確かめるために、卵子移植を行い、正常子兎を得たので(実験2)、その概要を報告する。

実験1 エストロジェン処理家兎の膣洗滌による卵子の採取

材料および方法

1. 採卵用家兎

性成熟に達している日本白色種雌家兎32羽をエストロジェン処理用とし、これらを正常雄と2回交配させ、同時に20~30 IUのHCGを耳静脈内に注射して排卵を確実にさせた。

2. 投与したエストロジェンの種類と投与量

エストロジェンの種類と投与量は、GREENWALD^{20~22,26)}の研究に基づいて決定し、Estradiol benzoate, Estradiol cyclopentylpropionate (ECP), Estradiol-17 β , Estroneの4種類を用いた。これらのエストロジェンは0.1 mlのゴマ油中に各々の決定された投与量が混入されているように調製した。エストロジェンの投与はすべて、1羽につき1回0.1 mlの筋肉内注射とし、原則

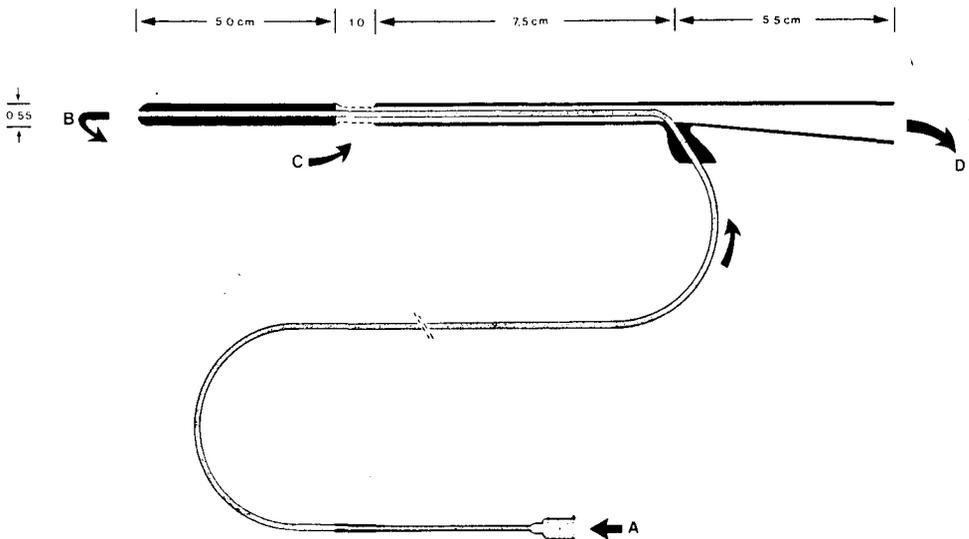


図1 膣洗滌に用いたカテーテルの構造模式

A点に接続された注射筒から洗滌液が注入される。洗滌液はカテーテル内のポリエチレン細管を通り、B点から膣内腔へと流出し、C点から再びカテーテル内に導入されD点からカテーテル外へ流出する。(矢印は洗滌液の流通経路を示す)

として交配直後と交配後48時間日に行った(表1)。

3. 膣洗滌方法

1) 洗滌器具

50 ml容の注射筒とヒト尿道用バルーンカテーテルを改造したものを膣洗滌器具として用いた(写真1)。カテーテルの構造模式および洗滌液の流動経路は図1の通りである。

2) 洗滌液

2%の割合にゼラチンを含む滅菌生理食塩水(0.85%)にペニシリンGカリウムおよび、硫酸ストレプトマイシンをそれぞれ最終濃度700 IU/ml, 500 μg/mlとなるように加えたものを洗滌液とし、洗滌に際しては約30°Cに加熱して用いた。

3) 膣洗滌方法

膣洗滌に先立ち、家兎の外陰部周辺の毛刈りを行い、兎用保定台に背面保定し、その後外陰部およびその周辺を消毒した。

カテーテルを外陰部から膣内に挿入後、保定板の頭部を持ちあげて約40°の傾斜をつけ、50~60 mlの洗滌液で膣内を洗滌した。カテーテル外端(図1, D点)から流出する洗滌液の液は100 ml容の試験管に回収し(写真2-4)、約20分間放置後、管底からピペットで約7 mlを時計皿にとり、解剖顕微鏡で卵子を検索した。洗滌は1

日1回とし、交配後24時間間隔で交配後7日目まで連続した。

実験結果

1. エストロジェン処理家兎の膣から採取された卵子の数

各エストロジェン処理区の交配後7日間における膣洗滌で得た卵子の数を表1に示した。

各エストロジェン処理区とも交配後1日目では、卵子は1個も採取されなかったが、交配後2日目から7日目にかけて合計72個の卵子が採取された。採取数は交配後2日目から4日目に多く、2日目11個(15.3%)、3日目28個(38.9%)、4日目23個(31.9%)であり、特に3日目と4日目の膣洗滌で全体の70%を占めた。しかし、5日目以降の採取数は激減し、5日目から7日目の3日間に採取されたものはわずか10個(13.9%)にすぎなかった。

次に各エストロジェンの処理別に、処理家兎数に対する卵子が採取された家兎数を比較すると、Estradiol benzoate 5 μg 2の回投与区、ECP 10 μgの1回および2回投与区、Estradiol-17β 50 μgの2回投与区、そしてEstrone 25 μgの2回投与区の5処理区で処理家兎の全例から卵子が採取された。その他の区では、全く卵子が

表 1 エストロジェン処理と膈からの卵子採取数

エストロジェンの種類	1回の 投与量 (μg)	処理した 時間 (交配後 の時間)	処理した 家兎数	卵子が採 取された 家兎数	交配後の各日の採卵数							計
					1	2	3	4	5	6	7	
Estradiol benzoate	5	0, 48	2	2	0	0	3	2	3	0	0	8
	10	0, 48	3	2	0	1	3	3	0	2	0	9
Estradiol cyclopenthy- lpropionate	10	0	3	3	0	1	0	4	0	0	0	5
	25	0	3	2	0	0	3	4	0	0	0	7
	10	0, 48	2	2	0	0	1	2	0	0	1	4
	25	0, 48	3	2	0	1	7	0	0	0	0	8
	25	0, 24	3	1	0	0	1	0	—	—	—	1
Estradiol-17 β	25	10, 48	3	2	0	5	0	0	—	—	—	5
	25	0, 48	3	1	0	1	1	0	0	1	1	4
Estrone	50	0, 48	3	3	0	0	5	4	1	0	0	10
	25	0, 48	2	2	0	2	0	4	1	0	0	7
	50	0, 48	2	1	0	0	4	0	0	0	0	4
総 計			32	23	0	11	28	23	5	3	2	72

表 2 エストロジェン処理家兎の膈からの採卵率

エストロジェンの種類	1回の 投与量 (μg)	処理した 時間 (交配後 の時間)	開腹家 兎羽数	排卵数	採卵数	採卵率 (%)	産子数	行方不明 の卵子数
	10	0, 48	1	11	6	55	0	5
ECP	25	0	1	14	5	36	3	6
	25	0, 48	1	12	6	50	0	6

採取されなかった個体があり、採取率はやや低くなっている。しかし、全く卵子が採取されなかった処理区はなかった。

各処理グループ別の採卵数は Estradiol-17 β 50 μg の 2 回投与区が 10 個, Estradiol benzoate 10 μg の 2 回投与区が 9 個, 同じく 5 μg の 2 回投与区が 8 個とやや多いが、これをエストロジェン処理家兎数および採卵された家兎数で比較すると、Estradiol benzoate の両区が他の区よりもやや高い。なお、ECP 25 μg の交配直後と 24 時間目、交配後 10 時間目と 48 時間目の 2 回投与区は、5 日目以後膈洗滌を行わなかったため採卵数は低くなっている。

2. エストロジェン処理家兎の膈洗滌による卵子採取率
エストロジェン処理家兎の膈からの採卵率を知るために、膈洗滌の最終日に採卵数の多かった家兎 4 羽 (Estradiol benzoate 区 2 羽, ECP 区 2 羽) を開腹して両側卵巢の排卵数を調べた。その結果は表 2 に示したとおりで、採卵率は 36~55% に達していた。これらの開腹した 4 羽は最終的に 0~3 羽の新生児を出産したが、採卵数と産子数の合計は排卵数と一致せず、4~6 個の卵子

が行方不明となっている。

3. 採取卵子の形態

交配後 7 日間に採取された全ての卵子の形態と各分割時期における個数を表 3 に示した。

交配後 2 日目に採取された 11 個の卵子のうち 1 個が 2-細胞期、2 個が 8-細胞期、6 個が 16-細胞期であった。

3 日目に採取された 28 個は桑実胚が 17 個、16-細胞期卵子が 2 個、残りの 9 個は未受精卵も含めて分割時期の不明な卵子、形態的に卵子に類似する卵黄様物、卵様物 (写真 10)、退化卵子 (写真 11, 12) である。4 日目では胚盤胞 14 個と桑実胚 5 個が得られ、その他に分割時期の不明な卵子や退化卵子が 4 個採取された。5 日目以降に採取された分割卵子は全て胚盤胞であったが、この時期の採卵数は少ない。したがって 7 日間に採取された分割卵子は、桑実胚が最も多く 30.6% (22 個) を占め、次いで胚盤胞が 25.0% (18 個)、16-細胞期卵子が 11.1% (8 個)、8-細胞期卵子が 2.8% (2 個)、2-細胞期卵子が 1.4% (1 個) の順であった。これらの分割卵子を写真 5-9 に示したが、その分割状態は正常家兎のものとはほとんど差がなく、ムチン層の薄い卵子が認められた (写真 6, 8)。

表3 エストロジェン処理家兎の膈内から交配後7日間に採取された卵子の数とその形態

交配後の日数	卵子の分割(細胞期)							計
	2-	4-	8-	16-	桑実胚	胚盤胞	その他 ^a	
1								0
2	1		2	6				2
3				2	17			9
4					5	14		4
5						2		3
6						1		2
7						1		1
計	1	0	2	8	22	18	21	72

a: 未受精卵, 退化卵, 卵様物, 卵黄様物を含む

実験結果

エストロジェン処理家兎から得た卵子の移植結果を表4に示した。

ECP 処理家兎からの交配後3日目桑実胚1個を左側卵管に移植したが、産子は得られなかった。しかし、同じく ECP 処理による2日目卵子2個(8-細胞期と16-細胞期)を左側卵管に移植して2羽の産子(♂, ♀)が得られた(写真13)。

Estradiol-17 β 処理家兎の2日目の16-細胞期卵子1個を左側卵管に、桑実胚4個を右側卵管に移植し、交配後10日目にこの被移植家兎を開腹して右側子宮角に2個の着床を確認した。その後1個は子宮内で吸収されたが、最終的に1羽の産子(♂)が得られた。同じく Estradiol-17 β 処理からの交配後4日目胚盤胞を左側卵管に植

表4 エストロジェン処理家兎の膈から採取された卵子の移植結果

エストロジェンの種類	採卵家兎へのエストロジェン処理		卵子を移植した日(交配後の日数)	被移植用の家兎羽数	移植した卵子数(分割時期)	移植した卵管	移植卵子からの産子数
	1回の投与量(μ g)	処理した時間(交配後の時間)					
ECP	25	0, 24	3	1	1(桑実胚)	左	0
	25	10, 24	2	1	1(8-細胞期) 2(16-細胞期)	左	2 (♂, ♀)
Estradiol-17 β	25	0	2	1	1(16-細胞期) 4(桑実胚)	左 右	0 1 (♂)
	50	0, 48	4	1	3(胚盤胞)	左	(2) ^a

a: 交配後18日目(移植後14日目)に屠殺開腹して、2個の着床を確認

実験2 エストロジェン処理家兎の膈から得た卵子の移植

エストロジェン処理家兎の膈より交配後2日目以降2-細胞期から胚盤胞期までの受精卵を採取できることが実験1で明らかになったので、採取された卵子の生存性の有無を調べるために、これら卵子の移植実験を試みた。

材料および方法

ECP 処理家兎から得た8-細胞期、桑実期の卵子各1個と、16-細胞期卵子2個、Estradiol-17 β 処理家兎から得られた16-細胞期卵子1個、桑実胚4個、胚盤胞3個の合計12個を4羽の排卵時期を同期化した偽妊娠家兎の卵管に移植した(表4)。なお、卵子は採取後移植まで約30°Cに保温した。卵子採取から移植までの時間は約45分であった。

し、この家兎を交配後18日目に屠殺開腹して、2個の着床を確認した。

考察

正常家兎の受精卵は交配後72~90時間頃初期胚盤胞となって子宮内に進入するが¹¹⁾、エストロジェン処理によって卵管内の卵子移送状態が変化し、しかもその投与量や投与時期によって異なることが知られている。例えば、BURDICK and PINCUS¹³⁾は交配時から毎日 Estrone を処理した結果、50%の卵子が卵管内に滞留したと報告し、PINCUS and KIRSCH³⁷⁾は交配前の数日間 Estrone を投与し、交配後24~96時間に開腹検査すると94%の卵子が卵管内にあったが、この処理を交配後から開始すると、交配後86時間でまだ50%もの卵子が卵管内に残っていたと述べている。一方、GREENWALD²⁰⁾の実験では5 μ gのEstradiol benzoateを交配後24, 48, 72時

間目と3回投与した場合、約45%の卵子が96時間目の卵管内に残っていたが、これと同量を交配直後と48時間目に投与すると、卵管内に存在する卵子は96時間でわずか4%に減少した。さらに、ECPを用いた同様な実験でも²⁴⁾、250 μ g投与は卵子の卵管内停滞をおこすが、25 μ gの投与では卵管の卵子移送が促進され、また子宮内でも卵子発見数の少ないことから、処理により卵子は子宮内を急速に通過して膈へ押し出されてしまうものと推測された。実際にCHANGら^{15~17)}はエストロジェンを経口投与した家兎の屠体を検査し、全排卵数の約2%にあたる卵子を膈内に発見している。一方、NOYES, ADAMS and WALTON³⁵⁾は卵巣を除去し尿道開口部手前の膈部を結紮し、エストロジェン処理した家兎の卵管に受精卵を移植し、移植後10~78時間で23%の卵子が膈内に認められたことを述べている。ADAMS^{2,3)}は片側卵巣除去や卵巣から直接黄体を取り除き黄体数を規制したところ、黄体数を減少させるに伴い子宮から膈へ排出される卵子数が増えることを認め、これはエストロジェンとプロゲステロンの均衡のくずれが子宮筋に作用を及ぼし、卵子が子宮に進入する時期が早まると、卵子は子宮内を急速に移動して膈へ押し出されてしまうと考えている。

受精卵の子宮内移動についての知見は乏しいが、BÖVING¹¹⁾は卵管から子宮角先端部に進入した卵子群は着床時の等間隔配置 (Spacing) へ向けて、順次子宮頸方向へ移動することを認めている。しかし、TSUTSUMI and HAFEZ³⁹⁾は正常交配後78時間目、すなわち卵子が子宮に出現して数時間後に既に一部の卵子が子宮頸の近くにまで移動していることを報告し、さらにTSUTSUMI and TAKEDA⁴⁰⁾は、偽妊娠家兎の未受精卵が交配後90時間で膈から採取されたことを報告した。これらのことは、卵子が子宮内で非常に活発に移動していることを示唆している。本研究では交配後48時間目のエストロジェン処理家兎の膈から受精卵が採取された。このことは一部の卵子の卵管内移動に要した時間が少なくとも30時間以上も短縮されており、子宮内進入後ただちに膈へ排出されたものと考えられる。しかし、エストロジェン処理家兎のうち約47%の家兎が妊娠を継続し産子を得ているので、生殖道内卵子の移動は、非常に変異のあるものと考えられる。実際に膈洗滌による採取卵には、卵管内を加速された卵子と滞留したと思われる両方の卵子が採取された。交配後2日目から3日目に採取された卵子はムチン層の付着が乏しかったが、4日目の胚盤胞に極端にムチン層の厚いものがあつた (写真9)。このことは、

エストロジェン処理により卵管内に卵子が滞留し、卵管分泌液に長時間浸っていたことを示すものであろう。ムチンの分泌は主に卵管峡部で行われる²³⁾ので、卵子はこの部位を急進するか否かによってムチン付着に差が生じるものと思われる。

卵子移送に卵管筋の収縮が大きく貢献している¹⁰⁾ことは事実であるが、卵管分泌液量の増減も大きな因子であるBLACK and ASDELL⁷⁾は卵管采部位の結紮により分泌液が貯留して卵管が著しく膨脹し、また、この貯留液が交配後60時間目までに消失することを報告している⁸⁾。一方、エストロジェン処理によって卵管の運動が増大する^{12,29,42)}とともに、卵管液の分泌も増すことが知られている^{6,9,2133)}。BLACK and ASDELL⁸⁾, SHARP and BLACK³⁸⁾によると、エストロジェン処理家兎の結紮卵管は交配後100時間以上にもわたり膨脹が持続し、その場合卵管液の分泌はエストロジェン処理後24~48時間目が最大である³³⁾。しかし、本研究では交配後48時間目で既に卵子は膈まで下降してきており、エストロジェン処理が卵管に卵子移送の効果を及ぼす時間と、分泌の開始時間とはかなりの差があるように思われる。GREENWALD²²⁾も指摘しているように、エストロジェン処理による初期段階での卵子移送は多量の卵管分泌液によるものではなく、むしろ卵管筋と子宮筋の収縮が主に作用しているのではないかと推測される。しかし、本研究の結果は生殖道内の卵子移動の生理的機構が従来から考えられているよりもさらに複雑であることを示している。

TSUTSUMI and TAKEDA⁴⁰⁾は、偽妊娠家兎の未受精卵が交配後90時間目以降に子宮頸を通して膈に出現してくることから、子宮頸が妊娠初期の卵子移動に何らかの役割を果しているのではないかと想定している。TSUTSUMI and HAFEZ³⁹⁾が、着床時前の子宮内卵子の発見率は排卵数に対しほとんど100%に近いとしているのに対し、エストロジェン処理で一部の卵子が膈にまで到達しているということは子宮頸にも無処理の場合とは全く異った機能的変化が生じているものと想定される。受精直後の子宮頸が分娩直前の子宮頸成熟に類似した開口状態を示しているとするならば、妊娠早期のエストロジェン投与と子宮頸および卵子移動との相互関係にきわめて興味ある問題を提起するものであろう。

次に採卵数についてみると、1羽あたりの単純平均は2.25個となり非常に低いが、卵子が全く採取されなかった9羽を除くと、平均3.13個となる (表1) しかし、比較的多く採卵し得た4羽の家兎では採卵率36~55% (表2) に達しており、これは少なくとも他の家兎でも同様の採卵

率をあげ得る可能性を示している。排卵数に対し行方不明の卵子が4~6個あったが、これは膣洗滌を7日目で終了したためその後排出された卵子を採取しなかったことも考えられる。さらに、予備実験で Sephadex G-100 を膣内に8~30個注入し、その5分後に膣洗滌を試みたところ、回収率は56~93%、平均81%であったことから、膣内に排出されても未回収のものがあるだろうことも推測される。また、膣洗滌の間隔を24時間にしたが、卵子の膣内滞留時間は不明であるのでこの時間内に膣内卵子が膣外(体外)へ流出する可能性も考えられる。GREENWALD²²⁾は、エストロジェン処理で交配後8日目には、82%の卵子が子宮外へ排出されたと推測しているが、本研究の結果はこの推測を下まわるものであった。しかし、今後洗滌器具の改良および洗滌間隔の短縮により、膣からの採卵率をあげることができるものと思われる。

正常な状態では膣に排出された卵子は妊娠とは全く無関係となるため、膣内卵子の生存性について関心の持たれなかったことは当然のことである。ただ ADAMS³⁾が発情家兎および偽妊娠家兎の結紮膣内に桑実胚を移植し、3日後にそれらは胚盤胞に発育していたが、それらを受容家兎子宮に再移植しても不妊に終わり、胚盤胞が生存性を有していないのではないかと考えた予備的実験があるに過ぎない。一方、妊娠初期のエストロジェン処理により妊娠中絶が起きることが知られており、エストロジェンと胚死亡との関係が種々調べられている。WHITNEY and BURDICK⁴¹⁾は、交配後14~36時間にエストロジェンを1回投与すると、卵子の子宮内進入が早まって12時間以内に退化すると報告したが、PINCUS and KIRSCH³⁷⁾は卵子が卵管内にある間は、エストロジェン投与は卵子の初期分割に影響せず、初期胚盤胞期に退化すると報告している。GREENWALD²⁶⁾はエストロジェン処理家兎の卵子は交配後4~5日目に退化するとしているが、これはエストロジェンが卵子に直接影響を及ぼしているのではなく、エストロジェン処理家兎の卵子が長時間にわたり卵管内に滞留されるために、卵子が退化するとし、NOYES, ADAMS and WALTON³⁵⁾はエストロジェン処理により卵子への多精子侵入が生じて卵子が子宮内で退化崩壊する可能性のあることも指摘している。

卵子に対するエストロジェンの直接作用についても検討されており PINCUS and KIRSCH³⁷⁾は Estriol を添加して24時間培養した卵子の発育には何ら有害効果はみられなかったとしている。しかし、MCGAUGHEY and DANIEL³⁴⁾は培養液中に Estradiol, Estrone, もしくは Estriol を添加すると卵子は24時間以内に崩壊してし

まうと報告し、DANIEL¹⁹⁾も家兎卵子をエストロジェンに *in vitro* で7時間さらしておくと、著明な細胞質の細片化と核の崩壊がおこるとしている。KETCHEL and PINCUS³²⁾の Estradiol, Stilbestrol を用いた実験では高濃度のエストロジェンにさらすと胚は致死的影响を受けるが、低濃度では胚の発育に影響はなかった。

他方、母体へのエストロジェン処理は卵子のムチン層の卵管内沈着を減少させるが、それらが子宮内胚盤胞の着床率を低め、その後の胚死亡率も高まることが知られている^{20,22,25)}。

本研究の結果から、エストロジェン投与は一部の卵子に急激な移動を強いるが、交配後4日頃までは必ずしも卵子に有害効果を見わけているわけではない。因みに交配後2,3,4日目の膣内卵子を移植して、着床を確認しさらに産子を得たことはエストロジェン処理や生殖道内の環境が卵子の生存性にあまり影響を及ぼしていないということを示しており、卵子は生殖道内の急速な移動による時間的かつ環境的变化にもかなりの抵抗性を有していることが示唆され、また膣内においてさえも卵分割と発育を進行させていたように推測される。CHANG and HARPER¹⁶⁾も Ethynyl estradiol を経口投与した家兎卵管からの卵子(授精後80~84時間)を移植して、交配後13日と19日に胎児と胎盤を確認しており、エストロジェンが卵管内卵子には無害であることを示している。

しかし、本研究では交配後5日目以降に採取された受精卵は退化胚盤胞であった。これは交配後に投与した多量のエストロジェンが、その本来のエストロジェンとプロジェステロンの均衡をくずし、プロジェステロン優性となるべき時期においても、卵子の発育に必要な卵管および子宮環境がまだエストロジェン優性を保つために、卵子の発育と生殖道内環境の不一致性が顕著なためと思われる。本研究では、交配後4日目までのエストロジェン処理家兎の膣内から形態的に正常な受精卵が採取されており、また通常の受精卵の経時的な分割および発育と比較しても差は認められず、移植結果でもその生存性が確認された。この膣内排出卵子が生存性を有している事実を証明したのは本研究が最初である。

すでに、牛、馬の大動物では子宮洗滌による生体からの受精卵回収に成功しているが、他の動物ではその例は見当らず、また移植用卵子を膣から全く非手術的に採取したのは本研究を嚆矢とする。本研究では膣洗滌を7日間に限定したが、これは着床が7日目に起こるため、それ以降の洗滌は無意味と考えた。しかし、退化卵子はそれ以降も排出される可能性があるため、本実験におけ

る行方不明の卵子の一部はその様なものである可能性がある。エストロジェンとして4種類を用い、膈からの採卵に有効なものを見い出そうとしたが、本研究の段階では例数も少なく、エストロジェン相互間の差は認められなかった。

要 約

交配後まもない家兔にエストロジェンを投与すると、卵管内の受精卵は急速に子宮内へ移動し、さらに膈へ排出されるものがあると推測されている。そこで、エストロジェン処理家兔の膈からの卵子の採取を試みた。

日本白色種家兔32羽に交配時と交配後24時間または48時間目に Estradiol benzoate (5 μ g, 10 μ g), Estradiol cyclopentylpropionate (10 μ g, 25 μ g), Estradiol-17 β (25 μ g, 50 μ g), Estrone (25 μ g, 50 μ g) をそれぞれ投与して、交配後1日目から7日目まで24時間間隔で膈洗滌を行った結果、低率ながら受精卵を膈から採取することに成功した。

交配後1日目では、どのエストロジェン処理区からも卵子は採取されなかったが、2日目から7日目にかけて、合計72個の卵子が採取された。その内訳は、2-細胞期1個、8-細胞期2個、16-細胞期8個、桑実胚22個、胚盤胞18個、退化卵子などが21個であった。

エストロジェン処理家兔の膈内に卵子が排出されることが知られたので、交配後2日目から4日目に膈から採取された12個の卵子を4羽の同期偽妊娠家兔に移植して、卵子の生存性を検討した。

その結果、3羽が妊娠し、このうち2羽の移植家兔から3羽の新生児が得られた。また他の1羽は妊娠18日目に屠殺開腹して2個の着床が確認され、エストロジェン処理家兔の膈内には生存性を有する受精卵が排出されているという事実が証明された。

(本研究の一部は文部省科学研究費、課題番号148065, によるものである)

引用文献

- 1) ADAMS, C. E. 1958. Egg development in the rabbit: the influence of post-coital ligation of the uterine tube of ovariectomy. *J. Endocr.*, **16**: 283-293.
- 2) ADAMS, C. E. 1965. Influence of the number of corpora lutea on endometrial proliferation and embryo development in the rabbit. *J. Endocr.*, **31**: xxix-xxx.
- 3) ADAMS, C. E. 1967. The influence of maternal

environment on preimplantation stages of pregnancy in the rabbit. In "Preimplantation Stages of Pregnancy", pp. 345-377. Eds. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O'CONNOR. J. & A. Churchill, LTD.

- 4) ALLEN, W. M. 1932. Physiology of the corpus luteum. VIII. Interrelationship of oestrin and the corpus luteum as determined by their effects in the adult rabbit. *Am. J. Physiol.*, **100**: 650-663.
- 5) ALLEN, W. M. and G. W. CORNER. 1929. Physiology of the corpus luteum. III. Normal growth and implantation of embryos after very early ablation of the ovaries, under the influence of extracts of the corpus luteum. *Am. J. Physiol.*, **88**: 340-346.
- 6) BISHOP, D. W. 1956. Active secretion in the rabbit oviduct. *Am. J. Physiol.*, **187**: 347-352.
- 7) BLACK, D. L. and S. A. ASDELL. 1958. Transport through the rabbit oviduct. *Am. J. Physiol.*, **192**: 63-68.
- 8) BLACK, D. L. and S. A. ASDELL. 1959. Mechanism controlling entry of ova into rabbit uterus. *Am. J. Physiol.*, **197**: 1275-1278.
- 9) BLACK, D. L., L. V. CROWLEY, R. T. DUBY and C. H. SPILMAN. 1968. Oviduct secretion in the ewe and the effect of oviduct fluid on oxygen uptake by ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **15**: 127-130.
- 10) BOLING, J. L. 1969. Endocrinology of oviductal musculature. In "The Mammalian Oviduct", pp. 163-181. Eds. E. S. E. HAFEZ and R. J. BLANDAU. University of Chicago Press.
- 11) BÖVING, B. C. 1956. Rabbit blastocyst distribution. *Am. J. Anat.*, **98**: 403-434.
- 12) BRUNDIN, J. 1964. An occlusive mechanism in the Fallopian tube of the rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, **61**: 219-227.
- 13) BURDICK, H. O. and G. PINCUS. 1935. The effect of oestrin injections upon the developing ova of mice and rabbits. *Am. J. Physiol.*, **111**: 201-208.
- 14) CHANG, M. C. 1966. Transport of eggs from the Fallopian tube to the uterus as a function of oestrogen. *Nature (Lond.)*, **212**: 1048-1049.
- 15) CHANG, M. C. 1966. Effects of oral administration of medroxyprogesterone acetate and ethynyl estradiol on the transportation and development of rabbit eggs. *Endocrinology*,

- 79: 939-948.
- 16) CHANG, M. C. and M. J. K. HARPER. 1966. Effects of ethynyl estradiol on egg transport and development in the rabbit. *Endocrinology*, **78**: 860-872.
 - 17) CHANG, M. C. and R. YANAGIMACHI. 1965. Effects of estrogens and other compounds as oral antifertility agents on the development of rabbit ova and hamster embryos. *Fert. Steril.*, **16**: 281-291.
 - 18) CORNER, G. W. 1928. Physiology of the corpus luteum. I. The effect of very early ablation of the corpus luteum upon embryos and uterus. *Am. J. Physiol.*, **86**: 74-81.
 - 19) DANIEL, J. C. JR. 1964. Some effects of steroids on cleavage of rabbit eggs *in vitro*. *Endocrinology*, **75**: 706-710.
 - 20) GREENWALD, G. S. 1957. Interruption of pregnancy in the rabbit by the administration of estrogen. *J. exp. Zool.*, **135**: 461-481.
 - 21) GREENWALD, G. S. 1958. Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelium of the rabbit. *Anat. Rec.*, **130**: 477-496.
 - 22) GREENWALD, G. S. 1959. The comparative effectiveness of estrogens in interrupting pregnancy in the rabbit. *Fert. Steril.*, **10**: 155-161.
 - 23) GREENWALD, G. S. 1959. Tubal transport of ova in the rabbit. *Anat. Rec.*, **133**: 386.
 - 24) GREENWALD, G. S. 1961. A study of the transport of ova through the rabbit oviduct. *Fert. Steril.*, **12**: 80-95.
 - 25) GREENWALD, G. S. 1962. The role of the mucin layer in development of the rabbit blastocyst. *Anat. Rec.*, **142**: 407-415.
 - 26) GREENWALD, G. S. 1963. Interruption of early pregnancy in the rabbit by a single injection of estradiol cyclopentylpropionate. *J. Endocr.*, **26**: 133-138.
 - 27) HARPER, M. J. K. 1961. The mechanisms involved in the movement of newly ovulated eggs through the ampulla of the rabbit Fallopian tube. *J. Reprod. Fert.*, **2**: 522-524.
 - 28) HARPER, M. J. K. 1964. The effects of constant doses of oestrogen and progesterone on the transport of artificial eggs through the reproductive tract of ovariectomized rabbits. *J. Endocr.*, **30**: 1-19.
 - 29) HARER, M. J. K. 1966. Hormonal control of transport of eggs in cumulus through the ampulla of the rabbit oviduct. *Endocrinology*, **78**: 568-574.
 - 30) HARPER, M. J. K., J. P. BENNETT, J. C. BOURSNESS and L. E. A. ROWSON. 1960. An autoradiographic method for the study of egg transport in the rabbit Fallopian tube. *J. Reprod. Fert.*, **1**: 249-267.
 - 31) HOWE, G. R. 1970. A study of egg transport in the rabbit using a freezing-clearing technique. *J. Reprod. Fert.*, **21**: 339-341.
 - 32) KETCHEL, M. M. and G. PINCUS. 1964. *In vitro* exposure of rabbit ova to estrogens. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **115**: 419-421.
 - 33) MASTROIANNI, L. JR., F. BEER, U. SHAH and T. H. CLEWE. 1961. Endocrine regulation of oviduct secretions in the rabbit. *Endocrinology*, **68**: 92-100.
 - 34) MCGAUGHEY, R. W. and J. C. DANIEL JR. 1966. Effect of oestradiol-17 β on fertilized rabbit eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **11**: 325-331.
 - 35) NOYES, R. W., C. E. ADAMS and A. WALTON. 1959. The transport of ova in relation to the dosage of oestrogen in ovariectomized rabbits. *J. Endocr.*, **18**: 108-117.
 - 36) PINCUS, G. 1965. Hormonal steroids and preimplantation stages. In "Preimplantation Stages of Pregnancy", pp. 378-417. Eds. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O'CONNOR. J. & A. Churchill, LTD.
 - 37) PINCUS, G. and R. E. KIRSCH. 1936. The sterility in rabbits produced by injections of oestrone and related compounds. *Am. J. Physiol.*, **115**: 219-228.
 - 38) SHARP, D. C., III and D. L. BLACK. 1975. The effects of tubal ligation on ovum transport in rabbits. *J. Reprod. Fert.*, **42**: 23-28.
 - 39) TSUTSUMI, Y. and E. S. E. HAFEZ. 1974. Distribution patterns of rabbit embryos during preimplantation stage. *J. Morph.*, **144**: 323-336.
 - 40) TSUTSUMI, Y. and T. TAKEDA. 1976. Evidence of expulsion of unfertilized ova into the vagina in pseudopregnant rabbit. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **47**: 509-517.
 - 41) WHITNEY, R. and H. O. BURDICK. 1938. Acceleration of the rate of passage of fertilized ova through the Fallopian tubes of rabbits by massive injections of progynon-B. *Endocrinology*, **22**: 639-642.

- 42) WIMPFHEIMER, S. and M. FERESTEN. 1939.
The effect of castration on tubal contractions of the rabbit, as determined by the rubin test. *Endocrinology*, 25: 91-95.

Summary

The rate of transportation of the newly ovulated eggs through the oviduct is altered by the exogenous estrogen and the eggs move into the uterus rapidly. It is generally assumed that few of these uterine eggs may be discharged into the vagina through the cervix. The present study was designed to recover the eggs from the vagina of estrogen treated rabbits by a non-surgical vaginal flushing method.

Thirty-two Japanese white adult female rabbits were treated with estradiol benzoate, estradiol cyclopentylpropionate, estradiol-17 β or estrone at the time of mating and 24 or 48 hr after mating. For egg recovery, vaginal flushing was made on each estrogen treated rabbit during 7 days after mating.

The results were obtained as follows:

The recovery of eggs from the vagina was possible by the estrogen administration and the vaginal flushing. No eggs were recovered in all estrogen-treatment groups on Day 1, but 72 eggs were recovered during Day 2 to 7. In particular, the eggs on Day 3 and 4 were recovered concentrically. It totaled 72 eggs, as follows: one 2-cell egg, two 8-cell eggs, eight 16-cell eggs, 22 morulae, 18 blastocysts and 21 degenerate eggs.

As the fact obtained showed that fertilized eggs were discharged into the vagina of estrogen treated rabbits, 12 of the eggs recovered from the vagina on Day 2 to 4 were transferred to four synchronized pseudopregnant recipients for testing of egg viability. Three of these recipients became pregnant, and two of them produced normal young. The other one produced 2 implants at autopsy on Day 18.

The fact that viable fertilized eggs were discharged into the vagina of estrogen treated rabbits was proved in this study.

図 版 1

- 1 洗滌用カテーテルと 50 mℓ 容注射筒。
- 2 カテーテルの膣内挿入開始。
- 3 カテーテルの膣内挿入終了。洗滌液回収用の試験管の用意。
- 4 洗滌液注入とカテーテル外端から流出する洗滌液の試験管への回収。家兎は頭部を持ちあげ、約 40° の角度で保定。
- 5 8-細胞期卵子。交配後 2 日目に採取。個々の割球間は不明瞭で、退化途上にある。ECP 25 μg を交配直後に投与。×410
- 6 16-細胞期卵子。交配後 2 日目に採取。ムチン層はうすい。Estradiol benzoate 10 μg を交配直後に投与。×240
- 7 桑実胚。交配後 3 日目に採取。ECP 25 μg を交配直後と 48 時間目に投与。×410

図 版 2

- 8 胚盤胞。交配後 4 日目に採取。ムチン層はうすい。内細胞塊が明瞭である。Estradiol benzoate 5 μg を交配直後と 48 時間目に投与。×240
- 9 胚盤胞。交配後 4 日目に採取。ムチン層が非常に厚い。ECP 25 μg を交配直後と 48 時間目に投与。×203
- 10 卵様物。交配後 6 日目に採取。Estradiol benzoate 10 μg を交配直後と 48 時間目に投与。×240
- 11 退化卵子。交配後 5 日目に採取。Estradiol benzoate 5 μg を交配直後と 48 時間目に投与。×240
- 12 退化胚盤胞。交配後 7 日目に採取。ECP 10 μg を交配直後と 48 時間目に投与。×240
- 13 ECP 処理家兎 (25 μg を交配後 10 時間目と 24 時間目に投与) から交配後 2 日目に採取された卵子の移植により生まれた 2 羽の新生児と被移植用家兎。

