

シマドジョウ 卵巢の硝子器内排卵について

宇都宮 泰明・宇都宮 妙子

(広島大学水畜産学部水産学科)

On *In vitro* Ovulation in the Ovaries of Spinous Loach

Yasuaki UTSUNOMIYA and Taeko UTSUNOMIYA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,

Hiroshima University, Fukuyama

(Tables 1-5)

緒 論

著者等は蛙脳下垂体前葉ホルモンによるシマドジョウの *in vitro* 排卵に関する実験を行ってきた。此の種の研究については、両棲類では多少行なわれているが魚類ではあまり例を見ない。

両棲類では Wright (1945) は *in vitro* の排卵が可能であると主張し、又 Samartino & Rugh (1945) は *in vitro* によるものは真の排卵ではなく単に組織の退化によるもので、真の排卵は起らないと云っている。Nadamitsu (1961) は両棲類における多くの実験例から排卵はたやすく起り得る事を述べているが、その受精能力については、はっきり述べていない。魚類についてはこのような実験例は殆んどないのであるが、Nadamitsu (1960) は、ドジョウの体腔内に蛙脳下垂体前葉ホルモンを注射後卵巢をとり出して弗化カリ溶液中にて *in vitro* に於ける濾胞破裂を見ている。此の場合排卵された卵は正常に発生を行なうと述べている。著者等は *in vitro* においてシマドジョウの未熟卵巢に蛙脳下垂体前葉ホルモンを作用させる場合、如何なる条件を与えると正常に近い成熟卵を得る事ができるかと云う事についてしらべた。

実験材料及び方法

実験材料としては、広島近郊で採集したシマドジョウ *Cobitis taenia striata* の採集後 2~3 日以内のもの、福山産小型シマドジョウ *Cobitis taenia striata* を屋外のコンクリート水槽に蓄養したものとを用いた。これらのものは実験室内の狭小な容器に入れておくと数日で脳下垂体前葉ホルモンが作用し難くなるので (川村 1944)、できる限り採集直後のものを用いるようにした。又同一実験の各卵巢片は同一個体のものを用いた。

in vitro 排卵の方法は、繁殖時期のシマドジョウの卵数約 50~100 個の卵巢片を 10 cc の蛙脳下垂体懸濁液を入れた管びんの中に入れ、これを 25°C の恒温水槽中に浸した。

未熟卵巢の卵は白色不透明で卵核が明瞭に見られるが、卵が賦活されて成熟分裂を開始すると、卵核が消失し白色からあめ色半透明となってくる (川村・本永 1950)。

最初に蛙脳下垂体前葉ホルモン懸濁液の最適濃度を知るために、リングル液 1 cc につき前葉 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 個のものについて実験を行った。此の場合リングル液の pH は 7.8 から 8.5 の範囲であった。

次に pH の影響を知るために前葉は 1 cc につき 1 個で懸濁液に用いたリングル液の pH 7.5 から

10.5の間の種々のものについて調べた。pHの調整はpH 8.8以下では重曹(NaHCO₃)のみで行なったが、此のpH 8.8の値は大変不安定で調整後数時間で変化した。pH 9.5以上ではMenzelの緩衝液(NaHCO₃, Na₂CO₃)を用いた。pH値の測定には鈴木式SZK水素イオン濃度比色測定器と三田村硝子電極pH測定機を用いた。

シマドジョウでは *in vivo* でもその蕃養状態により脳下垂体前葉ホルモンに対する反応にかなりの差が見られるので、いつでも好結果が得られるとは限らなかった。

結 果

1. 蛙脳下垂体前葉ホルモンの濃度 脳下垂体前葉懸濁液の濃度としては、魚類用リンゲル液 1ccにつき、トノサマ蛙脳下垂体前葉 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 個の場合について比較した (pH 7.8, 8.0, 8.5)。その結果は第1表に示した如くである。個体により差があったが、1/2, 1/4個の場合が最も経済的

Table 1. Relations between dosages of hormone and ovulation in 17 hours after immersing in hormone suspension.

intensity of hormone (individuals)		no. of eggs						
		2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	Cont.
A pH 7.8~8.0	ovulation	5	7	8	6	2	0	0
	transparent	10	13	14	28	16	4	0
	white	13	14	8	5	24	49	29
B pH 7.8~8.0	ovulation	1	1	4	2	1	0	0
	transparent	1	7	12	6	2	39	0
	white	25	23	25	17	26	7	23
C pH 8.5	ovulation	3	8	1	5	5	0	0
	transparent	5	12	1	4	19	0	0
	white	17	20	18	24	11	24	—

ovulation; number of ovulated eggs. The eggs were extruded from the fragments and cleaved normally after insemination.

transparent; number of eggs become transparent by the effects of hormone.

white; number of white eggs, or changeless eggs.

有効値であると考えられる。

in vitro で排卵されたこれらの卵は人工受精することによりいずれも正常に発生を開始した。此の結果から以下の実験は蛙脳下垂体1/2又は1/4個の濃度で行なった。

2. 処理時間 次にホルモン懸濁液中での処理時間と排卵率及び卵巣卵の透明化率との関係を見るために、懸濁液の濃度、リンゲル液 1cc につき1/2, 1/4個のもの二種類について、処理時間 3, 4, 5, 6, 7時間と全時間を行ない、各時間処理後はpHを調整した純リンゲル液中に移して排卵を待った。実験時間は大体12時間できり上げた。その結果は第2表に示す如くである。この表からもわかるように、1/4の方が1/2の場合よりも長時間作用させる必要がある。

此の様にして得られた卵は結果Iの場合と同様、人工受精により正常に發育して或る個体では4.4cmまで育てたが、その後は固定した。

多数の実験の結果、10時間以上ホルモン懸濁液に浸した場合、pH、ホルモン濃度の如何にかかわらず25°Cと云う高温のためか腐敗を起し、充分その結果を見届けられない傾向があるので、以下の実験では処理時間を短縮して途中からpHを調整しただけの純リンゲル液に移して観察した。

Table 4 Effects of value of pH of pituitary suspension and treating duration. (at 25°C)

pH of hormone suspension	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	9.4 (p.)	9.4 (p.)	9.4 (p.)	9.4 (p.)	9.4 (p.)	9.4 (p.)	9.0 (p.)	9.0 (p.)	9.0 (p.)	10.3	10.3	10.0	10.0	9.4	9.4	9.0	9.0									
duration	10 min.	10 min.	30 min.	30 min.	1 hr.	1 hr.	10 min.	10 min.	30 min.	30 min.	1 hr.	1 hr.	10 min.	10 min.	30 min.	30 min.	1 hr.	1 hr.	5 hrs.	5 hrs.	5 hrs.	con- tinuity	//	//	//	//	//	//	//										
H of Ringer's solution	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8 (p.)	8.8	8.8	8.8	8.8	/	/	/	/	/	/	/	/										
I	ovulation	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	4	—	5	—	5	—	16	17	4	—	—	—	—	—	—	—	—									
	transparent	—	—	1	—	—	8	—	12	—	—	—	—	5	—	6 (E. 3)	—	10	—	10	13	6	—	1	6	7	2	1	—	—									
	semitransparent	—	—	5	—	—	—	3	7	—	—	9	—	—	—	4	—	4	—	3	11	3	—	—	—	—	—	—	—	—									
	white	30 (D.)	29 (D.)	46 (D.)	39 (D.)	46 (D.)	16 (C.)	13	27	20	39	25	24	18	29	19	30	22	23	32	28	65	18 (C.)	29 (C.)	36 (C.)	30 (C.)	34	34	37	38									
pH of hormone suspension	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.4 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	10.0 (p.)	9.5 (p.)	9.5 (p.)	9.5 (p.)	9.5 (p.)	9.5 (p.)	9.5 (p.)	8.8 (p.)	8.8 (p.)	8.8 (p.)	8.8 (p.)	10.4	10.4	10.4	10.4	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.5	9.5	9.5	9.5		
duration	10 min.	30 min.	1 hr.	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	10 min.	30 min.	1 hr.	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	10 min.	30 min.	1.5 hrs.	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	5 hrs.	5 hrs.	con- tinuity	//	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	3 hrs.	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	3 hrs.	1½ hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	3 hrs.	1½ hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	3 hrs.	
H of Ringer's solution	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	/	/	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8
II	ovulation	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	8	8	11	41	23	21	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	transparent	3	—	—	—	2	—	5	6	7	12	11	11	13	27	6	3	7 (E)	6	7	3	1	4	—	—	3	5	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—	1	
	semitransparent	—	31	17	21	17	23	13	13	16	12	22	—	14	—	12	3	4	1	5	2	12	6	38	28	11	5	9	4	6	14	6	20	20	20	11			
	white	25 (C.)	8 (C.)	4 (C.)	7 (C.)	5 (C.)	11 (C.)	16	16	14	7	3	2	20	15	10	4	11	5	11	11	1	2	31	19	17	33	38	32	23	24	41	38	24	28				
pH of hormone suspension	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0 (p.)	9.0 (p.)	9.0 (p.)	9.0 (p.)											
duration	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	3 hrs.	3.5 hrs.	4 hrs.	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	3 hrs.	3.5 hrs.	4 hrs.	1.5 hrs.	2 hrs.	2.5 hrs.	3 hrs.	3.5 hrs.	4 hrs.	con- tinuity	//	//	//	//	5 hrs.	5 hrs.	con- tinuity	//												
H of Ringer's solution	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	/	/	/	/	/	8.8	8.8	/	/												
III	ovulation	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	18	—	—											
	transparent	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	22	13	24	26												
	semitransparent	4	17	16	15	13	6	29	40	16	39	26	17	27	35	34	18	31	38	8	7	20	15	—	4	13	12												
	white	26 (D.)	17 (D.)	10 (D.)	2 (C.)	19 (D.)	16 (D.)	9	18	8	10	6	6	7	9	9	24	6	14	24	39	23	36	59	4	3	16	9											

(C.) Cytolysis (D.) Distend (E.) Elevation (p.) pituitary suspension

Table 2. Relations between ovulation and treating duration with frog pituitary suspension.

	no. of pituitary per 1 cc of Ringer's solution	no. of eggs	3 hrs.	4 hrs.	5 hrs.	6 hrs.	7 hrs.	cont. in hormon sol.	cont. in Ringer's sol.
I	1/2	ovulation	0	1	1	0	0	5	changeless
		transparent	4	8	14	7	6	9	
		white	105	72	84	54	71	59	
II	1/4	ovulation	0	0	0	3	0	4	changeless
		transparent	0	0	(4)	9	12	28	
		white	0	0	91	74	58	34	

Case of immersing Ringer's solution after treating by hormone in respective duration.
number in () is number of extruded white eggs.

3. pH の影響 生体内の pH は弱アルカリであることを前提として行ったこれまでの予備実験から pH の値がかなり高い方が良い結果を得られたので、pH の影響を見るために次の実験を行った。

即ち *in vitro* で卵巣片に脳下垂体前葉ホルモンを作用させる場合、その懸濁液の pH の値として 7.5 から 10.5 に至る間を調べた。II の実験結果から本実験では懸濁液による処理時間を 3~5 時間とした。その結果は第 3 表に示す如くである。

Table 3. Relation between value of pH of pituitary suspension and ovulation (at 25°C)

pH of hormone solution				8.8 (p.)	8.5 (p.)	8.2 (p.)	7.8 (p.)	7.4 (p.)	Cont.
duration (hrs.)				3.5	〃	〃	〃	〃	
pH of Ringer's solution				8.0	8.5	8.2	7.8 (p.)	7.4	
I	ovulation			63	10	4	—	—	changeless in any value of pH
	transparent			9	6	25	22	—	
	semi-transparent			—	3	—	—	26	
	white			25	45	63	40	42	
pH of hormone solution		10.5 (p.)	9.9 (p.)	9.4 (p.)	8.8 (p.)	8.5 (p.)	8.0 (p.)	7.5 (p.)	Cont.
duration (hrs.)		4.5	〃	〃	〃	〃	〃	〃	
pH of Ringer's solution		10.5	9.9	9.4	8.8	8.5	8.0	7.5	
II	ovulation	—	—	—	22	—	—	—	pH 10.5 (D.)
	transparent	—	7	40	48	1	—	—	9.9 (D.)
	semi-transparent	—	—	—	—	—	19	4	9.4 (D.)
	white	60	93	61	59	139	127	115	changeless

(D); Distend, (p); pituitary suspension

表からもわかる如く、pH の値 8.8 の場合が最も排卵率が良く、9.5 又は 8.5 になると急激に排卵率が下がることがわかった。

pH の値が 9.5 以上になると卵巣卵の大部分は、大きくふくらんで破壊した。その程度は pH 9.4 の場合が最も軽度で pH の値がそれより高くなるに従って甚だしかった。

そこで次に高い pH の値によるホルモン懸濁液による処理時間を10分, 30分, 1時間, 1時間30分, 2時間, 2時間30分に短縮し後は pH 8.8 の純リンゲル液に移して見た. その結果を第4表に示す. 然し結果は良くなかった. その原因がホルモン懸濁液による処理時間の不足にあるかも知れないと考えられたので純リンゲル液のかわりに pH 8.8 のホルモン懸濁液にも移して見たが後者は前者より多少良い結果が得られたが, 何れにしても例えば短時間でも一度高い pH の値の液で処理されたものの排卵率は悪い結果となった. これは高い pH の値によって濾胞などの組織がいためられるためと考えられる. これらの対照実験として pH を調整した純リンゲル液中に卵巣片を入れたが実験区対照区のいずれも pH 9.4~10.5 の場合には卵塊の中心部に少数ながら透明卵が生じた. しかしこれらは透明になるだけであって排卵には至らなかった. 更にこれらにトリプシン溶液を加えた実験でもやはり排卵させることはできなかった.

又これらの卵を切片にして検鏡した所では, 正常賦活卵の如く卵核は消失して卵黄顆粒は大きな塊になっていた (川村, 本永1950).

これらの実験において排卵した卵はいずれも受精能力があった.

4. 生体卵巣内の pH 値 上の実験において *in vitro* では pH の値が8.8 の場合が排卵には最も効果的であることがわかった. そこで蛙脳下垂体前葉をドジョウに注射後, 生体内の卵巣内の pH の値を測定する目的で本実験を試みた.

シマドジョウ 1 個体につき, トノサマ蛙脳下垂体前葉 3 個を注射し, その後約10分間隔毎に開腹して, 微小硝子電極を用いて pH 値を測定した. 卵巣の肉眼的構造は, 卵塊が袋状に包まれているのでその袋を裂き, 中の卵塊のひだの間に電極を挿入するようにした. 又測定間隔は, 準備の都合で8分から15分にわたるずれを生じた.

測定後の卵巣は, その個体にホルモンの効果があったか否かを見るために, pH 8.8 のリンゲル液中に卵巣片を切り出して移し前記の方法にて排卵を確かめた. その結果は第5表に示す如くである. これ

Table 5. Changes of value of pH in ovaries which were injected with frog pituitary suspension

individuals	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	cont.			
												1	2	3	
elapsed time to measurement	3.50	3.58	4.40	4.55	5.03	5.40	5.47	5.54	6.05	6.10	6.16	—	—	—	
pH of ovary	6.80	6.80	6.60	6.35	6.66	6.65	6.66	6.25	6.60	6.85	6.75	6.9	6.8	6.8	
observation <i>in vitro</i> after measurement of pH	ovulation	10	22	6	2	0	25	22	8	1 (9)	15 (31)	9 (1)	0	0	0
	transparent	18	19	18	22	12	5	12	17	12	7	8	9	0	11
	white	25	25	7	14	13	14	17	15	10	5	22	14	28	18

Observation in controles was done about 12 hours after immersing ovary in pituitary suspension.

によるとホルモン注射後排卵までの間, シマドジョウ生体内の卵巣内の pH 値は6.6から6.8前後で大きな変化は全く見られなかった.

論 議

in vitro で繁殖時期中のシマドジョウの未熟卵巣片に蛙脳下垂体前葉ホルモンを作用させて成熟卵を得るための種々の条件について実験を行なったが, これらの結果を総合して考察すると, 重曹のみで pH 値を調整した pH 8.8 と云う高い値のリンゲル液を用いた場合が排卵には最適であり, しかもこのようにして得られた卵は正常な成熟分裂をしており, いずれも受精能力をもっている. これはシマドジ

ヨウにおいては *in vitro* で脳下垂体前葉ホルモンを作用させた場合、真の排卵が起り得ることを示している。しかし生体内ではホルモンが血行を介して卵巣に作用するのに対し、*in vitro* の場合にはホルモンの効果が pH 8.8前後の限られた範囲において最適であると云うことは、ホルモンを効果的に働かせるための滲透圧に関係があるように考えられる。故にこのことは、生体内でホルモンが作用する場合に必要な条件を意味するものではないと考えられる。又ホルモンの効果は *in vitro* の場合でも或一定時間処理され、一度賦活を始めれば、その後は惰性的に進むと考えられる。

文 献

- 川村智治郎, 1944 鱒類放養の基礎的研究.
 川村智治郎・本永妙子, 1950 シマドジョウに於ける人工排卵について 魚類学雑誌 1 (1) 1-7.
 NADAMITSU, S. 1961 Studies on *in vitro* Ovulation in vertebrates III. *In vitro* ovulation in the fish J. Sci, Hiroshima Univ., Ser B div. 1, 20: 17-27.
 SAMARTINO, G. T. and R. RUGH 1945 Frog ovulation *in vitro* Jour. Exp. Zool., 98 (2): 153-159.
 WRIGHT, P. A. 1945 Factors affecting *in vitro* ovulation in the frog. Jour. Exp. Zool., 100 (3): 565-575.

SUMMARY

- (1) Some factors affected to ovulation from fragments of the ovaries of spinous loaches immersed in frog pituitary suspension during the breeding season *in vitro* were researched.
- (2) On density of hormone suspension, $\frac{1}{2}$ or $\frac{1}{4}$ of frog pituitary per 1 cc of Ringer's solution were effective for ovulation.
- (3) On treating duration by hormone suspension, it was the most effective for ovulation that fragments of the ovaries of spinous loaches were immersed in frog pituitary suspension between 3 or 5 hours and then were removed in pure Ringer's solution regulated value of pH.
- (4) The most effective value of pH was 8.8 for ovulation.
- (5) The value of pH in the ovary of the spinous loaches which were injected with frog pituitary suspension were between 6.6 or 6.8.
- (6) Thus the eggs ovulated from the fragments *in vitro* cleaved normally after insemination.