

メダカの卵子形成、特にその細胞化学的研究

山 本 正

(北大, 理学部動物学教室)

Morphological and cytochemical studies on the oogenesis of the
fresh-water fish, medaka (*Oryzias latipes*)

Tadashi S. YAMAMOTO

(Dept. Zool., Fac. Sci., Hokkido Univ., Sapporo, Japan)

は し が き

動物の卵子形成過程についての形態学的研究はかなり古くからなされてきて、魚卵についても CUNNINGHAM ('93-95, '98), WALLACE ('03), EGGERT ('29), KONOPACKA ('35), ITO ('38) 等の報告が見られるが、卵子形成過程における細胞乃至組織化学的变化も組織化学的実験技術の向上とともに次第に興味の対象となり近年多くの業績が相次いで現れ、脊椎動物卵でも VOSS ('31), MARZA et al. ('37), BRACHET ('47), OSAWA ('51), MAS ('53) などの魚類、両棲類についての報告がある。

他方、受精の問題に関し、近年、卵活性化にともなう表層顆粒乃至表層胞の放出、崩壊を含む顕著な形態変化がくわしく追求され、また生化学的にも卵活性化の際における物質変化が次第に明らかになりつつあるが、これらの過程が卵子形成過程といかなる関係にあるかと云うことは、なお不明な点が多い。そこでこの見地から、魚卵の卵子形成過程にともなう形態的ならびに蛋白、脂肪、多糖類、核酸等の細胞化学的变化を新たに取上げ、その第一段階としていかなる過程を経て成熟卵となるかを少しく調べて見た。

本研究の一部は卒業研究('52)として行つたものである。本文に入るに先立ち、本稿の御校閲をたまわつた北大、理学部動物学教室、市川純彦教授ならびに、終始御指導、御鞭撻をたまわつた同教室、狩野康比古助教授に深謝する。

材 料 お よ び 方 法

体長3乃至4cm内外の成熟した緋メダカおよび野生のメダカ (*Oryzias latipes*) の雌を使用、一般形態観察には Bouin または Allen-Bouin 液にて固定、パラフィンまたはセロイジンパラフィン法にて10 μ の切片となし、Delafield ヘマトキシリンおよびエオジンまたは Heidenhain アザン染色あるいはヤーヌス緑、トルイジン青等の塩基性色素にて染色検鏡した。

細胞化学的観察では、脂肪はフォルマリン固定後凍結切片または Ciaccio 法でパラフィン切片としスダンIVで染色、あるいは Voss ('31) の方法に従つて Plasmal 反応を行いパラフィン切片となして検鏡、多糖類検出には Allen-Bouin 液で固定パラフィン切片として Hotchkiss 法または Bauer 法で染色、蛋白は Salzar のタンニン鉄法、アミノ酸は xanthoprotein, Millon, Romieu 反応により、また、チモ核酸は Feulgen 反応によりそれぞれ検出した。

結 果

1. 一般形態 卵巣は不対で peritoneal membrane に包まれ腹腔の腸管背面にある。内部は二部分に分れ、背側に広い空所の ovarian lumen がありこれは後方では輸卵管に続く。これ

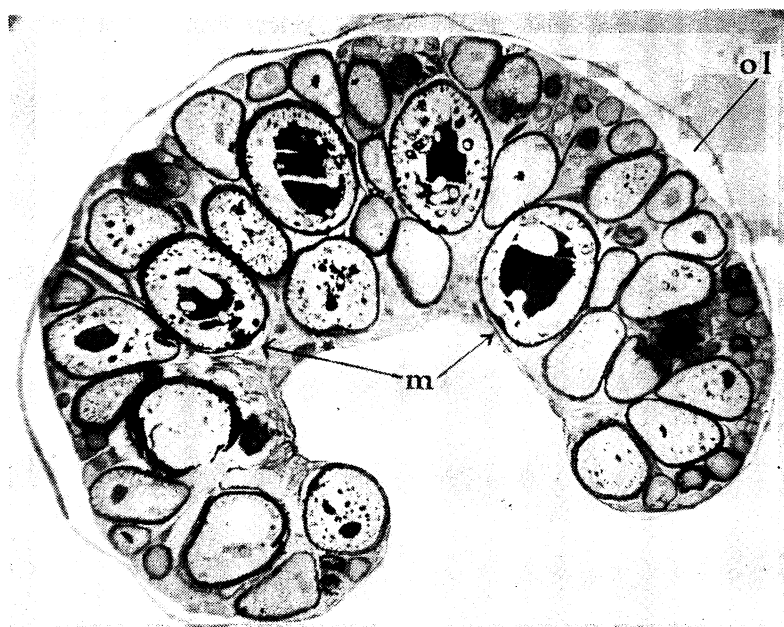


Fig. 1. Photomicrograph of transverse section of the ovary showing ovarian lumen and stroma which is divided into lamellae containing large number of oocytes. The older oocytes are found in the basal part of lamellae, but the younger ones in the periphery of lamellae. The micropyles of older oocytes turn toward the ventral side of the ovary. ca. $\times 22$. m, micropyle; ol, ovarian lumen.

を除く腹側部が種々の発達段階にある卵母細胞を含む組織 ovarian stroma である (Fig. 1)。ovarian lumen の壁は柔軟な三層の組織で、最外層の血管に富む繊維性組織、筋肉性中間層及び最内層の繊毛細胞層からなる。ただし輸卵管部では繊毛細胞層を欠く。ovarian stroma は襞状の ovarian lamellae に分れ、若い卵母細胞と成熟近くの卵母細胞はお互に lamella の周辺部に見出されるが、完全な濾胞細胞層に包まれた大型卵母細胞は stroma 内深部に見出され、各卵母細胞間は粗い結締組織で埋められている。したがって、lamella 周辺部にて形成された若い卵母細胞は一度 stroma 内深部に移動しここで十分に生長し、成熟間近になると再び lamella の周辺部に移動、ついに lamella の表面を破つて ovarian lumen に出、輸卵管を通つて産卵されるのであろう。

成長期の卵母細胞を見ると Fig. 2 に示したように直径約 100μ 迄の若い卵母細胞は塩基性色素に染る不連続な濾胞細胞層に包まれ、その中央には明確な核膜で包まれた球形の核、いわゆる胚胞がある。この核中には極く若い卵母細胞では (Fig. 2, A) 多くのクロマチンが見られるが、後にそれは消失し塩基性色素に染まるいわゆる周辺仁が核膜に接して多数現れるが、それ以外の核の部分は achromatic で塩基性色素にも酸性色素にも染まらない。細胞質は塩基性色素に染まり、とくに核附近が細胞周辺部よりもより濃く染まる (Fig. 2, B)。なお、この段階の卵母細胞後期には細胞質周辺部に塩基性色素に染まる一小球体が生ずるが、これは卵黄核であつて、カレイやヨオジウオ等多くの海産魚で CUNNINGHAM ('93-95, '98) や WALLACE ('03) は、それが初め核に接して存在していたものが、後に周辺部に移動したものであると云うが、メダカではその初期の状態を明らかになし得なかつた。この後この卵黄核は細胞の生長とともに大きくなるが同

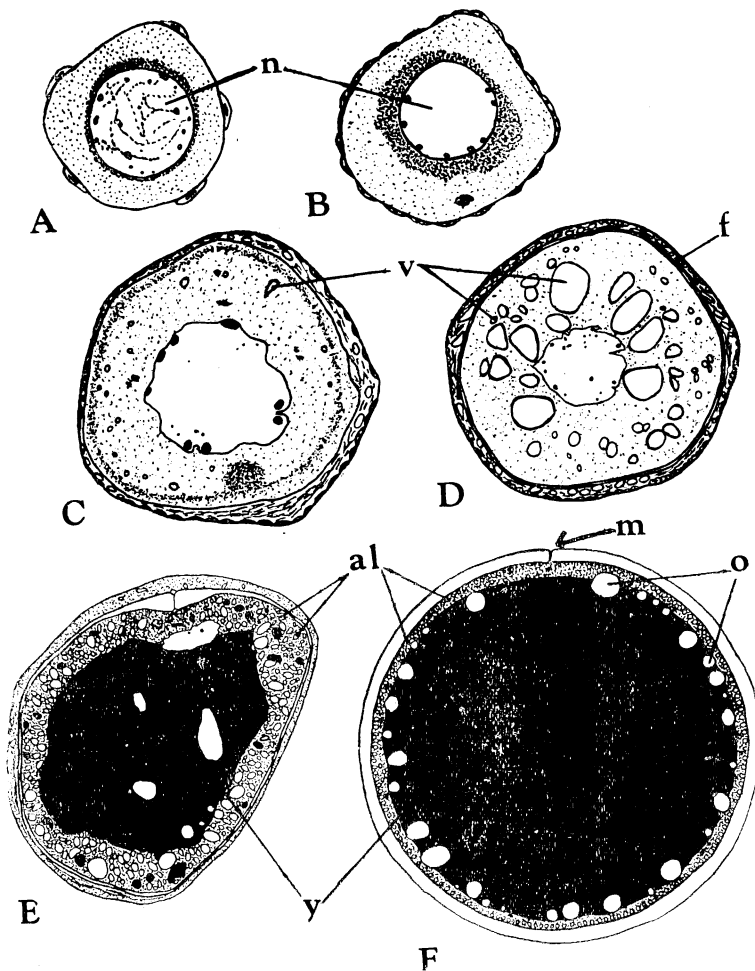


Fig. 2. Semi-diagrammatic summarization of the growth period of oocyte. (A), ca. $\times 1250$; (B) and (C), ca. $\times 300$; (E), ca. $\times 45$; (F), the mature unfertilized egg omitted the attaching organ, ca. $\times 45$. al, cortical alveoli; e, vesicles in the younger oocyte; f, follicular epithelium; m, micropyle; n, nucleus (germinal vesicle); o, oil drops; v, vesicles; y, yolk.

時に次第に形が不明瞭となる。卵母細胞が次の段階にまで生長すると(直径 150μ)、細胞質の塩基性色素に対する染色性は低下するが、この頃になると細胞質周辺部に小さな胞状物 vesicle が現れる (Fig. 2, C)。この vesicle は *Fundulus* の卵母細胞で GUTHRIE ('28) が proteneous yolk vesicle あるいは KONOPACKA ('35) が *Cyprinus* 等で見た gouttes claires に相当するものであり、後に述べるようにこれが成熟卵の表層胞となると考えられるものであるが、ここでは単に vesicle と呼んでおく。また、この段階になると卵母細胞とそれを取りまく濾胞細胞層の間に卵の附着器官である絨毛と附着毛が生じ、続いて卵膜が認められるようになる。卵膜は生長とともに厚さを増すが、他方、細胞質においては以前周辺部に見られた小型の vesicle の他になお大型な vesicle が核附近に新たに出現する (Fig. 2, D)。核の形はこの時期では不規則となり核膜は不明瞭となる。卵母細胞が生長し直径 500μ 近くになると細胞質は新たに次々と生じた vesicle で充満する。さらに卵母細胞が生長すると核内容がわずかに塩基性色素に染るよう

になり, それとともに動物極へ移動を開始するが, 他方, 細胞中央部では卵黄形成がはじまる。卵黄は Ciaccio 法による固定の場合のみ極めて不明確な顆粒状構造となるが, 他の方法では形成の初期より顆粒状構造ではなく切片ではいずれも板状である。これ等卵黄はその後次第に増加し, 遂にかたまつて大きな卵黄塊を形成する (Fig. 2, E)。核は動物極へ移行し, 卵膜直下に来るに従い次第に扁平となり, 以前核膜に接して見られた仁が中央部に集まつて見られるようになるが, この場合その内部にクロマチン質は認められない。その後, 核, いわゆる胚胞は崩壊し, 卵は成熟卵の形態を取るが, この場合中央部には卵黄塊, 周辺部には表層胞を含む周辺細胞質が見られ細胞質と卵黄との間には処々油滴が存在する (Fig. 2, F, Fig. 3)。なおこの時期では動物極の細胞質が他の部分より多い。成熟卵の表層に見られる表層胞は以前見られた vesicle がこれに相当すると考えられるが, このことに関しては後に論述する。

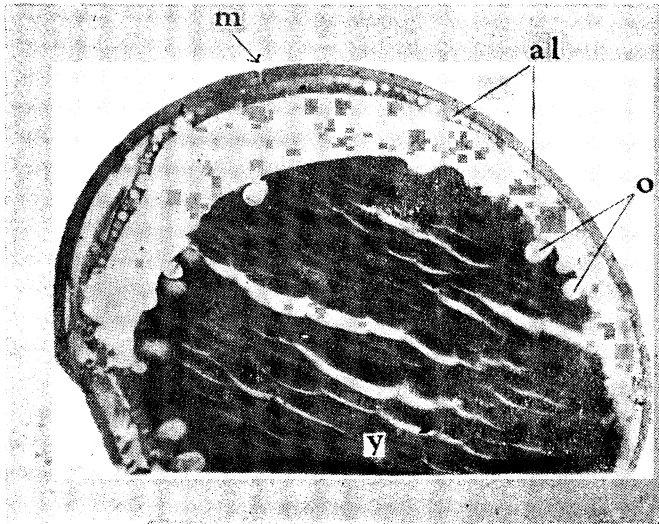


Fig. 3. Photomicrograph of the vertical section of the animal half of mature unfertilized egg. ca. $\times 70$. al, cortical alveoli; m, micropyle; o, oil drops; y, yolk.

なお細胞質中に vesicle が現れる頃, 仁の中に一乃至二個の屈折率の高い極めて小さな球体が現れ, 卵の生長とともにその数を増す。同様な仁の構造的変化は CUNNINGHAM ('93-95), MAKINO ('34), 大沢および林 ('52), 山本(喜) ('54) も魚類や両棲類で見ているが, この小体に関して種々な推測を下しているが, その機能などは不明である。ただし, メダカではこれはチオニン, ビスマルク褐, ナイル青, コンゴ赤などで黒く染まり, ヘマトキシリン, ピロニン, サフラニン等では染まらなかった。

vesicle, すなわち, 後で成熟卵の表層胞となるものは空虚なものでもまた脂肪を含むものでもなく, 卵巣を遠心すると常に遠心端に集まることから, これが形成初期より卵内容中最大の比重を有することがわかつたが, この内容は固定液の種類により保存されたり失われたりする。すなわち, Allen-Bouin 液による固定, あるいは Regaud または Kiyono 法によるミトコンドリア固定法では良好に保存されるが, フォルマリン, アルコール,

なお細胞質中に vesicle が現れる頃, 仁の中に一乃至二個の屈折率の高い極めて小さな球体が現れ, 卵の生長とともにその数を増す。同様な仁の構造的変化は CUNNINGHAM ('93-95), MAKINO ('34), 大沢および林 ('52), 山本(喜) ('54) も魚類や両棲類で見ているが, この小体に関して種々な推測を下しているが, その機能などは不明である。ただし, メダカではこれはチオニン, ビスマルク褐, ナイル青, コンゴ赤などで黒く染まり, ヘマトキシリン, ピロニン, サフラニン等では染まらなかった。

vesicle, すなわち, 後で成熟卵の表層胞となるものは空虚なものでもまた脂肪を含むものでもなく, 卵巣を遠心すると常に遠心端に集まることから, これが形成初期より卵内容中最大の比重を有することがわかつたが, この内容は固定液の種類により保存されたり失われたりする。すなわち, Allen-Bouin 液による固定, あるいは Regaud または Kiyono 法によるミトコンドリア固定法では良好に保存されるが, フォルマリン, アルコール,

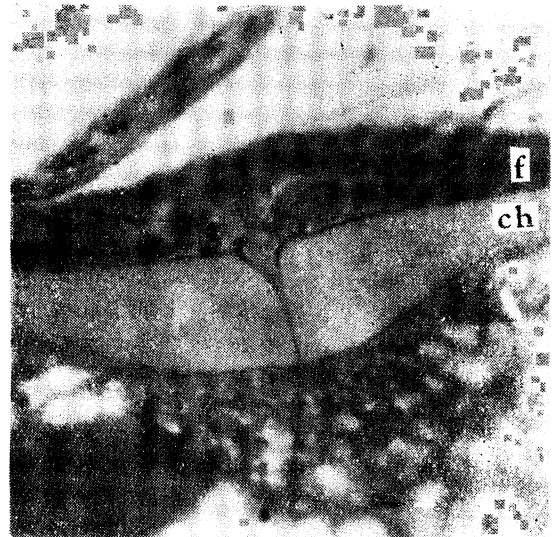


Fig. 4. Photomicrograph of micropyle in the older oocyte corresponding to stage (E) in Fig. 2, having a large micropylar cell. ca. $\times 450$. ch, chorion; f, follicular epithelium.

Zenker, Gilson, Bouin 液等では十分には保存されない。Allen-Bouin 液で固定した材料について染色を見ると、これは筆者の用いた範囲では、スピリット青、アザン染色のアズカーミン以外の塩基性色素には染まるが、アザン染色のアニン青以外の酸性色素には染まらない。またアユ卵の表層胞と同様（伊東 '53）ムチカーミンでは淡いが明瞭に染まる。したがってこの内容は粘液様のものと考えられる。

魚卵の卵膜には動物極に一個の卵門があり、受精に際し精子はこの卵門を通つて卵内に侵入するが、まだ濾胞細胞で包まれている大きな卵母細胞の時期では、この部分のみ濾胞細胞は多層であつて、その内特殊な achromatic な一個の細胞が卵門に楔状に入っているのに気が付く（Fig. 4）。このことは古くから知られているが（EIGENMANN '90, EGGERT '29）、この細胞の核は塩基性色素に対する染色性が甚だ弱い。この細胞—此处では卵門細胞と呼ぶこととする—を目当てとして卵門形成を遡ると、まだ明確な卵膜の出来ていない卵母細胞の時期でも、卵門細胞が卵母細胞に接して存在することが観察されたが、その由来を明らかになし得なかつた。この細胞は初めから他の濾胞細胞よりはるかに大きく、細胞質に富んでいて卵の生長とともに生長し、卵膜が認められる頃になると、Fig. 5 のごとく卵母細胞と合一したように見えて、卵のその部分は卵膜を欠いている。卵母細胞の生長とともに卵門細胞の周囲の卵膜は特に厚さを増し、初めは単なる卵膜の小孔に過ぎなかつた卵門は筒型となり、やがて成熟卵で見られるごとく漏斗状卵門となる（Fig. 4）。

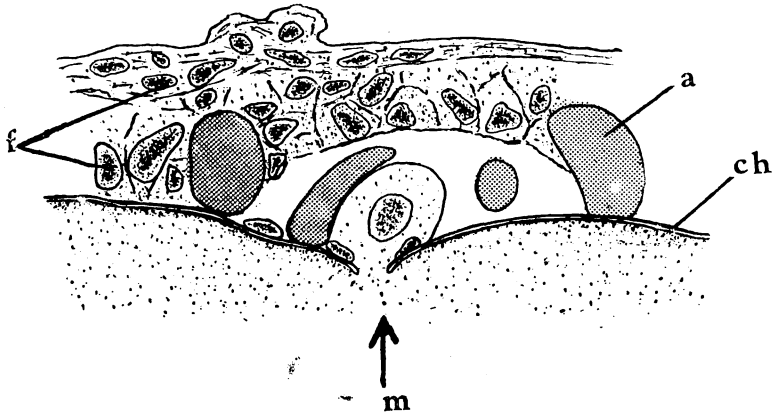


Fig. 5. Semi-diagrammatic figure of the micropyle of the younger oocyte corresponding to stage (D) in Fig. 2. ca. $\times 1900$. a, attaching organ; ch, chorion; f, follicular cells; m, micropyle.

単なる小孔にすぎない若い卵母細胞の卵門が ovarian lumen に面して居ることを少数の細胞で観察し得たが、筒型または漏斗状卵門はいずれも stroma の内深部に向いている。同様な事実は EIGENMANN ('90) も 2 乃至 3 種の魚で認めているが、このことから卵母細胞が stroma 深部に移動する際は回転するものと考えられる。

2. 細胞化学的観察 上述するとき卵子形成過程は、その顕著な蛋白質の増加と関連し、細胞化学的にも大いに興味の対象となるので、蛋白、脂肪、多糖類、チモ核酸の消長について少しく調べて見た。

(i) 蛋白反応 一般反応としては Salzar のタンニン鉄法、また蛋白を構成するアミノ酸の形では xanthoprotein, Millon, Romieu 反応を用いて検出したが、いずれの場合にも同様な結果であつた。すなわち、細胞質は vesicle 形成以前では核より強く反応するが、vesicle 形成後では核より弱い。また、これら蛋白反応は卵母細胞の核、細胞質のほかには濾胞細胞でもまた

卵膜, 絨毛, 附着毛でも陽性であるが vesicle のみ陰性な結果であつた。

(ii) 脂肪 脂肪は若い卵母細胞ではまったく見られないが, vesicle が出現すると突然核の近くに直径 2 乃至 4 μ の顆粒となつて出現し次第に量を増してやがて vesicle と vesicle の間の細胞質はこの脂肪顆粒で充たされ, 細胞周辺部まで拡がったものは卵黄の出現前後になると処々で合一し, 大きな塊りとなり, いわゆる油滴を形成する。生長した卵母細胞を凍結切片で調べると脂肪は油滴中のみ多量に認められ, 卵黄中には極めて少量であるが, Ciaccio 法によるとこの他卵黄形成中の卵母細胞では細胞質にも卵黄中にも脂肪が見出される。この卵黄中のものは油滴と同じ位に検出されるから, この方法では lipoprotein が検出されたのではないかと考える。なお核には脂肪はまったく認められない。

Voss ('31) の方法により Plasmal 反応を示す phosphatide を検出して見ると, 卵黄の現れるまで反応は認められないが, 卵黄出現後は卵黄周辺に反応を認めた。しかし, この場合昇汞醋酸液では細胞が良く固定されないので, この反応が卵黄周囲のいかなる部分に基くか確認し得なかつた。なお卵巣内部の血管壁は Voss も見たように明らかに Plasmal 反応を示した。

(iii) 多糖類 Hotchkiss 法に従うと多糖類は油滴以外の卵膜を含むあらゆる部分に認められたが, Bauer 法では一様ではなく vesicle と細胞質で強く, 卵黄では極めて弱い。若い卵母細胞では脂肪と同様多糖類もまったく見られないが, vesicle の出現と同時に vesicle の中に初めて現れ, その後細胞質にも現れて来るが, 核では決して検出されない。Best カーミンで染色すると Bauer 法と同じ染色分布を示すが, これは非常に弱い。また, このような染色像は Langhans ヨード法では得られず唾液にも消化されないので固定, 脱水中にグリコーゲンは溶解し, こゝで検出されているのはグリコーゲン以外のものである。また vesicle はトルイジン青により赤く染まり, 中性赤ではメタクロマジーを示して黄褐色に染まる。このメタクロマジーは LISON ('35, '53) に従えば高分子の硫酸エステル, すなわち, 多糖類の硫酸エステルであることを示し, 多糖類の硫酸エステルは complex mucopolysaccharide の内 sulfomucopolysaccharide (MEYER '45) として知られているものであるから, vesicle に含まれる多糖類は sulfomucopolysaccharide の形で存在すると考えられる。

(iv) チモ核酸 Feulgen 反応の結果生長期の大部分において卵母細胞の核はチモ核酸を含まぬことが分つた。BRACHET が指摘したように核中のチモ核酸が極度に分散した結果このような状態になつたとも考えられるので卵巣を遠心して (3100 \times G) 検出したが結果は陰性であつた。これに反し卵門細胞を含む濾胞細胞の核は常に陽性の反応を示した。

論議および結論

メダカの卵巣は他の一般魚のものと異なり不對であるが, WOLF ('31) が, *Platyepoecilus* でまた FRIESS ('33) が *Xiphophorus* で報告したようにこれは初め左右一対として生じたものが癒合した結果生じたもので, ovarian lumen も初め左右に生じた各卵巣内の ovarian cavity が合一して生じたものであろう。また卵巣の stroma の部分がいくつかの lamellae に分れていることは CUNNINGHAM ('98) や MATTHEWS ('38) がいろいろな硬骨魚の卵巣で報じた状態と一致し, これ等の lamella は germinal epithelium で包まれている。

すでに述べたようにメダカの卵母細胞は初め lamella を取り巻く germinal epithelium に生じた後卵門の向を内深部に向けて回転して一度 stroma の深部に移動して生長する。成熟の近付いた卵細胞は今度は卵門を内深部に向けたまゝ回転することなく lumen に近付き, 濾胞細胞を脱ぎ棄て, germinal epithelium を破り lumen に出, lumen 壁の絨毛細胞に助けられて輸卵

管に移動，産卵されると考えられる。

次に卵子構成要素の形成過程を考察すると，初め achromatic であつた核内容は vesicle の出現期より塩基性色素に染まるようになり，仁には屈折率の高い小体が現れ，それとともに核の近くに脂肪が出現する。多糖類も細胞質および vesicle の中に現れ，蛋白反応もこの時期以後では核に於ても強くなるから，卵母細胞は vesicle の出現期に大きな変化を起すことは間違いない。各生長期における卵母細胞および核の最大直径をそれぞれ比較して，その生長速度として見ると，初めは両者が同一速度で生長すると考えられるが vesicle 出現期以後は核の生長は止まり，むしろ大きさを減少する。したがつて，このことも vesicle 出現期における卵母細胞の大きな変化を示し，HANN ('27) が *Cottus* で vesicle 出現以後を secondary growth phase と呼んで，それ以前の時期を区別していることは適切な考えである。しかし，このような大きな変化の準備は相当以前から行われていると考えられ，若い卵母細胞で核近くの細胞質が細胞周辺部より塩基性色素に濃く染まることは両棲類などで知られているごとく (BRACHET '47) リボ核酸が仁から放出されていることを示すものであろう。仁または仁内容が細胞質へ放出されることは EGGERT ('29)，ITO ('38) 等も主張しているところである。卵を産み続けている卵巣では，若い卵母細胞を多数有するのに対し，vesicle 出現後の卵母細胞の数がそれよりはるかに少いことは，この準備期間が相当長く vesicle 出現から排卵迄は時間的に短いことを示しているのではなからうか。

魚卵の卵膜の形成に関してはすでに多くの研究がある。卵膜は卵自身により，またいわゆる附着層は濾胞細胞により作られると結論されているが (EGGERT '29)，筆者も絨毛，附着毛を除く卵膜は卵自身により作られると考える。なぜなら，もし卵膜が濾胞細胞により作られるならば，卵門細胞の上においても他の部分と同様な濾胞細胞が存在するから，当然卵および卵門細胞を包む卵膜ができ，卵門を生じないこととなる。卵門細胞が卵膜を溶解する作用があるとすれば卵門は典型的な漏斗状とはなり得ないだろうし，また切片を観察してもまつたくそのような徴候は認められない。卵自身が卵膜を構成する物質を分泌し，卵門細胞がこれを分泌しなければ，当然こゝに卵門細胞の直径に相当する孔が開き卵門となると考えられる。たゞし，現在のところ実験的には調べられていないので，これら機構は推察に止まる。要するに，卵膜は卵細胞自身により作られ，卵門細胞は卵膜形成には関与しないと考えられる。

卵膜の化学的性質に関しては，これが蛋白及び Hotchkiss 陽性の多糖類を含み酸性色素に染まり，トルイジン青によりメタクロマジーを示さないゆえ，少なくとも蛋白および多糖類を含み，かつ塩基性のものである。この結果は哺乳動物卵，すなわち，ネズミおよび兎の卵の zona pellucida で得られた結果 (BRADEN '52) と非常に類似する。

WILSON ('25) は卵門細胞の由来に関してそれは多分 ovarian epithelium の細胞から生ずると述べているが，メダカ卵では不明で，その役割も上述のほか，何も云えない。多くの無脊椎動物で卵母細胞には一個または数個の栄養細胞が附着しているものもあるが，メダカの卵門細胞を栄養細胞と考えれば，濾胞細胞のほかに栄養細胞を有する卵包型 (follicular type) と哺育型 (nutrimentary type) の中間型であると云える。

卵母細胞への外部からの物質導入に関しては古くから卵膜に見られる条線 radial canal, pore canal がこの役割を果していると考えられている (WALLACE '03, WILSON '47, その他)。濾胞細胞の細胞質が常に好塩基性である点や卵門細胞がこゝに使用したいかなる色素にも親和性を欠くことは卵母細胞の栄養に何か関係があるかも知れないが，この栄養の導入は少なくとも卵母細胞で見られるような完成した形で送り込まれるとは考えられない。また，vesicle 出現期頃より，

仁内部にコンゴ赤等に染まる小体が明瞭に認められることから、卵母細胞内では仁が大きな働きをしているであろうと考えられる。仁内部のこの小体の出現が MAKINO ('34) と同様に仁崩壊の徴候であると考えれば、vesicle 出現期頃より仁は崩壊を開始したと考えられ、かつ、この頃核膜が不明瞭になるので、この時初めて現れる脂肪、多糖類の形成の中心が核にあると云うことができる。

卵母細胞の周辺部に見出される卵黄核の役割に関し、両棲類ではこれが顕著な Plasmal 反応を示し (VOSS '31, BRACHET '47) 脂肪は卵黄核を中心として合成されると考えられているが、KONOPACKA も他の魚卵で見ているようにメダカでは卵黄核は Plasmal 反応を示さず、脂肪も初めは核の近くから現れるので、この場合は卵黄核に脂肪形成の中心があるようには見えない。しかし、卵黄核が CUNNINGHAM も他の魚で見たように初め核に附着していたものであるならば、必ずしも脂肪と関係がないとは言い切れないが、前述せるとくメダカでは核に接した卵黄核は見出し得なかつた。CUNNINGHAM の観察したいろいろな硬骨魚では卵黄核が卵黄出現後も卵黄中にその姿を止めているが、メダカの場合には核の近くに vesicle が形成される以前に消失してしまう。脂肪出現に関しては他の多くの観察と一致し、それは常に核の近くから現れる。

生長期中の卵母細胞の核に於ける Feulgen 反応の消失、すなわち、チモ核酸の消失について述べると、BRACHET ('47) は両棲類において卵母細胞の核は生長期のいかなる時期にもチモ核酸を含むが、ある場合には、それが極端に分散して顕微鏡的に見えなくなると述べ、そのような場合でも遠心すると集合して再び見えるようになることを明らかにした。筆者の場合では前述せるとく、この反応は卵巣を遠心 (3100×G, 40 分) しても得られなかつた。

KONOPACKA ('35), MARZA et al. ('37) によれば筆者の見た vesicle は細胞質の周辺部に先ず現われ、その後内側に拡がると云うが、メダカの場合はむしろ核の近くに現れたものが外側に向う傾向があるが、これが如何様にして生ずるかは今のところ不明である。

卵黄は CUNNINGHAM ('93-95) が見た少数の例の他は、いずれも卵母細胞の周辺部から現れると一般に信ぜられているが、メダカでは卵黄は卵母細胞の中心から現れる。卵黄が中心部から生じ vesicle も中心部に多数見られるので、MARZA 等の云う intravesicular yolk および extraventricular yolk の内の intravesicular yolk がこれに相当するようには思えるが、実際には卵黄の現れる部分では vesicle は見られないので、この場合は intravesicular yolk と extraventricular yolk の区別があるとは思えない。

メダカの卵黄は形成初期から顆粒状構造はまつたく示さないと云えるが、Ciaccio 法で固定した場合は卵黄の塊りの中に極く不明瞭に顆粒状構造が見られる。これは Ciaccio 法で卵黄中の脂肪が沈澱せられたためと思われるので、メダカの卵黄には脂肪が特に多いと云えるだろう。卵が成熟するに際していわゆる胚胞の崩壊直前まで卵黄は顆粒状構造を示し、後にたがいに合一して成熟を完了する魚卵もあるが (川村および本永 '50), メダカ卵ではこの顆粒状構造は普通の方法では形成の初期から全く認められなかつたので、成熟に達するまでには卵黄顆粒の合一と云う時期はない。

表層胞の由来を見ると、卵黄形成以前の卵母細胞の細胞質に出現した vesicle が中心の卵黄塊に押されて表層に達し、成熟卵のいわゆる表層胞自身になることが塩基性色素による染色性および多糖類を特に多量に含むと云う化学的性質からわかつた。最近 AKETA ('54) は同じくメダカを用い表層胞の起原について述べ、それが卵黄出現後に "pre-cortex" に現れると云い筆者が見た初期の vesicle は単に "vacuole-like body" と呼び、その後の行動等については言及せず、これが表層胞になるとは考えていない。同氏は Bensley 液を用いて固定したが、筆者の考えでは

この固定液では若い卵母細胞の vesicle の内容は十分には保存されず、また多数の vesicle が生じている場合でもこの内少数の vesicle の内容のみがある程度保存されるに過ぎず、これが多糖類の反応を示した結果、このような結論に達したのではなかろうか。Bouin 液で固定した材料で筆者も同氏と同一な染色像を卵母細胞が示すのを見たが、Allen-Bouin 液を用いた場合には同氏の云う“vacuole-like body”もすべて多糖類の反応を示したので、若い卵母細胞で見られた vesicle も表層胞自身であることがわかる。

成熟卵の表層胞がリポイド壁を有すると云う考えは YAMAMOTO (T.) ('51) により提起され、後に AKETA ('54) は筆者と同じ Ciaccio 法を用いてリポイド検出を試みその存在を確認したが、重クロム酸処理を7日間より30日間にまで延期し調べたが筆者の場合には表層胞にリポイド壁は認め得なかつた。またフォルマリン乃至 Ciaccio 固定の卵の卵膜をはがすと、表層原形質は卵膜とともに卵黄から離れ、卵膜内側の原形質中に埋つた表層胞を見ることができる。すなわち、KANOH ('50) の卵膜剥離法を行い、これを染めて見ても表層胞にリポイド壁を認め得なかつた。Ciaccio 法により固定切片とした場合、油滴が完全には保存されず、中央部がぬけてリポイド環となる場合が往々にして見られる。小さな油滴がこのような状態を示すと一見表層胞のリポイド壁と誤認しやすい。

vesicle, すなわち、表層胞の内容について筆者は普通の染色結果から前に述べたようにそれが粘液様物質であると考え。純化学的見地から一般に生体の粘液様物質は mucopolysaccharide と呼ばれている。このことは細胞化学的方法で vesicle の内容が多糖類を含みトルイジン青や中性赤でメタクロマジーを示すことから達した結論と一致する。最近 KUSA ('53, '54) および AKETA ('54) も表層胞が多糖類を含むことを報じ、さらに硬骨魚卵において KONOPACKA ('35) は軟骨の matrix とこの vesicle の内容を染色反応により比較し、それが mucoprotein であるとするに指摘しているが、これ等はいずれも筆者の結果と良く一致し、また最近 MAS ('53) が *Perca* の卵子形成過程を調べた際、彼の stage IV における“vacuole” (筆者は表層胞と考える) が hyaluronic acid, すなわち、acid polysaccharide を含むと述べた点とも類似する。さらに vesicle の内容が硫酸根を有することは KONOPACKA が vesicle の内容と比較した魚の軟骨から FÜRTH および BRUNO ('37) がコンドロイチン硫酸を分離したことにより裏付けられる。メダカ卵において蛋白こそ検出し得なかつたが表層胞が細胞質内に生じ、かつその内容が acid mucopolysaccharide であることはウニ卵の表層顆粒の性質と一致し (MONNÉ および HÅRDE '51)、両者が受精時に類似の行動をとることと思ひ合わせ興味あることである。メダカ卵に存在する mucopolysaccharide がミトコンドリア固定法である REGAUD または KIYONO の方法で固定されることは、ウニ卵の表層顆粒が同じくミトコンドリア保存液である Champy 液で固定されること (MOTOMURA '41) と一致し、一見して vesicle の起原とミトコンドリアの間に何等かの関係があるように思えるが、実際にはこの間に関係はないらしい。このことは KONOPACKA ('35) が他の魚の卵子形成過程の観察でミトコンドリアは細胞質に散在していると報じたことから推察される。ゴルヂ体と vesicle の関連性は *Rita* や *Ophiocephalus* の卵子形成過程の観察で NATH および NANGIA ('31) は否定しているが、ゴルヂ体に mucopolysaccharide が存在することはこれが vesicle 形成との間に関連のあることを示しているかも知れない。

引 用 文 献

- AKETA, K. 1954: The chemical nature and the origin of the cortical alveoli in the egg of the (柳田研爾)
Medaka, Oryzias latipes. Embryologia, ii, 63—66.

- BRACHET, J. 1947 : Embryologie Chimique. Paris.
- BRADEN, A.W.H. 1952 : Properties of the membranes of rat and rabbit eggs. Aust. J. Sci. Res. (Biol.), v, 460—471.
- CUNNINGHAM, J. T. 1893—95 : Experiments and observations made at the Plymouth laboratory. J. Mar. Biol. Ass., iii, 247—277.
- 1898 : On the histology of the ovary and of the ovarian ova in certain marine fishes. Quart. J. Micr. Sci., xl, 101—163.
- EGGERT, B. 1929 : Entwicklung und Bau der Eier von *Salarias flavounbrinus* RUPP. Zool. Anz., lxxxiii, 241—253.
- EIGENMANN, C. H. 1890 : On the egg-membrane and micropyle of some osseous fishes. Bull. Museum Comp. Zool. Harvard Coll., xix, 129—154.
- FRIESS, E. 1933 ; Untersuchungen über die geschlechtsumkehr bei *Xiphophorus helleri* HECKEL. Arch. Ent.-Mechan., cxxix, 255—355.
- FÜRTH, O. und T. BRUNO, 1937 : Zur Kenntnis der Chondroitinschwefelsäure I. Biol. Zeitschr., ccxciv, 153—173.
- GUTHRIE, M. J. 1928 : Further observations on the ovarian eggs of *Fundulus*. Anat. Rec., xli, 64—65.
- HANN, H.W. 1927 : The history of the germ cells of *Cottus bairdii* GIRARD. J. Morph., xliii, 427—497.
- ITO, S. 1953 : アユ卵の受精並びに発生に対する塩濃度の影響. 動雑, lxii, 323—326.
(伊東 誠雄)
- ITO, T. 1938 : Ueber die Formveränderung der Randnukleolen der wachsenden Oozyten bei einem Knochenfish mit besonderer Berücksichtigung auf die Frage über dem Austritt der Nukleolarsubstanz ins Zytoplasma. Cytologia, ix, 283—306.
- KANO, Y. 1950 : Ueber Wasseraufnahme und Aktivierung der Lachseier. I. Annot. Zool. Jap., (狩野康比古) xxiv, 13—21.
- KAWAMURA, T. and T. MOTONAGA, 1950 : シマドジョウに於ける人工排卵について. 魚雑, i, 1—7.
(川村智次郎) (本永妙子)
- KONOPACKA, B. 1935 : Recherches histochimiques sur le développement des poissons. I. La vitello-génèse chez le Goujon (*Gobio fluviatilis*) et la Carpe (*Cyprinus carpio*). Bull. Acad. Polonaise Sci. et Let. (Sér. B), 163—180.
- KUSA, M. 1953 : On some properties of the cortical alveoli in the egg of the stickleback. Annot. (久佐 守) Zool. Jap., xxvi, 138—144.
- 1954 : The cortical alveoli of the salmon egg. Annot. Zool. Jap. xxvii, 1—6.
- LISON, L. 1936, 1953 ; Histochemie Animale. Paris.
- MAKINO, S. 1934 : A cytological study on the maturation and fertilization of the egg of *Hynobius retardatus* (an Urodelan Amphibian). J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. (Zool.), iii, 117—167.
- MARZA, V.D., E.V. MARZA, and M. J. GUTHRIE, 1937 ; Histochemistry of the ovary of *Fundulus heteroclitus* with special reference to the differentiating oocytes. Biol. Bull., lxxiii, 67—92.
- MAS, F. 1952 : Contribution à l'histologie de l'oogénèse chez un Téléostéen : *Perca fluviatilis*. L. Bull. Soc. Zool. France, lxxvii, 414—425.
- MATTHEWS, S.A. 1938 : The seasonal cycle in the gonads of *Fundulus*. Biol. Bull., lxxv, 66—74.
- MEYER, K. 1945 : Mucoids and glycoproteins. Adv. protein Chem., ii, 249—275.
- MONNÉ, L. and S. HÅRDE. 1951 : On the cortical granules of the sea urchin egg. Ark. Zool., i, 487—498.

- MOTOMURA, I. 1941: Materials of the fertilization membrane in the eggs of Echinoderms. Sci. (元村 勲) Rep. Tôhoku Imp. Univ. (Biol.), xvi, 277—307.
- NATH, V. and M. D. NANGIA, 1931: A demonstration of the vacuome and the golgi apparatus as independent cytoplasmic components in the fresh eggs of teleostean fishes. J. Morph. lii, 277—307.
- OSAWA, S. 1951: Histochemical studies of alkaline phosphatase in the oogenesis and the early (大沢省三) embryogenesis of the amphibia. Embryologia, ii, 1—20.
- and Y. HAYASHI, 1952: イモリ卵母細胞の生長期におけるリボ核酸代謝. 科学, xxii, 309—310. (林 雄次郎)
- SCHARFF, R. 1888: On the intra-ovarian egg of some osseous fishes. Quart. J. Micr. Sci., xxviii, 53—74.
- VOSS, H. 1931: Untersuchungen mit der Plasmalfärbung am Axolotlei. Zeitschr. Anat. Entwickl., xciv, 712—732.
- WALLACE, W. 1903: Observations on ovarian ova and follicles in certain teleostean and elasmobranch fishes. Quart J. Micr. Sci., xlvii, 161—213.
- WILSON, E. B. 1925, 1947: The Cell in Development and Heredity. New York.
- WOLF, L. E. 1931: The history of the germ cells in the viviparous teleost, *Platypoecilus maculatus*. J. Morph., lii, 115—153.
- YAMAMOTO, T. 1951: Action of lipoid solvents on the unfertilized eggs of the Medaka (*Oryzias* (山本 時男) *latipes*). Annot. Zool. Jap., xxiv, 74—82.
- YAMAMOTO, K. 1954: クロガレイの卵母細胞に於ける仁の行動について. 動雑, lxiii, 110. (山本喜一郎)

Résumé

The study was carried out concerning the morphological and cytochemical changes of developing oocytes in the ovary of the Japanese killi-fish, medaka (*Oryzias latipes*). The morphology of the ovary and the minute structures of developing oocytes are described with special reference to the formation of micropyle, chorion (egg membrane) and attaching organ (Figs. 1, 2, 3, 4, 5).

In the cytochemical studies, protein, lipid, polysaccharides and nucleic acid are detected with the following methods or reactions: for protein, Salzar's, Millon's or Romieu's methods and the xanthoprotein reaction; for lipid, Ciaccio's method and the method of frozen section; for polysaccharides, Bauer's and Hotchkiss' reaction; for nucleic acid, Feulgen's reaction.

The results are as follows:

1. The chorion and the attaching organ contain at least protein and non-acid polysaccharides.
2. Oil drops of the mature-egg are formed by fusion of fat granules which appeared at first in the perinuclear cytoplasm of the oocyte.
3. The cortical alveoli of the mature egg are identical with the "vesicles" appeared in the young oocyte, which are formed at first in the neighborhood of the oocyte nucleus at the time of appearance of fat granules. The "vesicles" in the young oocyte or the cortical alveoli of the mature egg contain at least acid polysaccharides, and from the results of cytochemical reactions (Lison's method for polysaccharide sulfate compound and the other methods used) and of the staining affinity to mucicarmine, neutral red,

etc., it is concluded that polysaccharides of the alveoli exist as a form of sulfomucopolysaccharides (MEYER '45) which is similar to the mucus found in every part of the tissue.

4. The existence of the lipoid wall of the cortical alveolus has been reported by AKETA ('54) in the same material, but the author could not find out such lipoid wall using the same method adopted by AKETA, i.e. Ciaccio's method. Furthermore, the alveolus prepared with KANOH's stripping method ('50) in formalin-fixed material does not stain with Sudan IV. Consequently, it is likely that the lipoid wall of the alveolus must be very delicate even if it is present.