

シマドジョウに於ける人工排卵について*

川村智治郎・本永妙子

(廣島文理科大學動物學教室)

魚類に於いて生殖腺刺戦ホルモンの注射によつて排卵を促進する實驗は、Houssay('31)が南米産の一小魚に他の魚の脳下垂体抽出液を注射して成功したのが最初で、それ以來多くの報告がなされた。これらの研究を通覽すると、魚類には生殖腺刺戦ホルモンに對して感受性の強いものと弱いものがあることがわかる(川村、'47)。強いものは魚類の脳下垂体前葉ホルモンばかりでなく、姉婦尿や哺乳類の脳下垂体前葉ホルモンに反応して排卵するが、弱いものはこれらに殆んど反応しないで、ただ魚類や兩棲類の脳下垂体前葉ホルモンによつてのみ排卵があつた。この様に人爲的に魚類の排卵を起させることが可能となつたが、排卵が如何なる経過で起るかについては、今日未だ殆んど何も知られていない。

本研究はホルモン注射によつて起る卵巣の變化を細胞學的に追跡し、更に硝子器内に取り出した卵巣片がホルモンの刺戦によつて排卵するか否かを確めることが目的である。これによつて、魚の種類及び生殖腺刺戦ホルモンの種類の差による反應の違ひの原因を分析的に探求する糸口が得られるものと期待される。

材料と研究方法

この研究に用いたシマドジョウは主にスジシマドジョウ (*Cobitis taenia striata*) と言われるもので、廣島縣福山市附近から採集した新鮮な材料及び鳥取原産で卵から飼育して成熟せしめたものである。この外、廣島市郊外で採集したスジシマドジョウとシマドジョウ (*Cobitis biwae*) をも使用した。これらの魚の排卵は川村('44)の方法によるトノサマガエルの脳下垂体前葉ホルモンの注射によつて起させた。又、脳下垂体前葉のホルモンを含む Ringer 或いは Holtfreter 氏液の中に卵巣の一片を入れて、排卵を起させた。排卵實驗の多くは 25°C の定溫で行い、僅かの場合にのみ約 21°C の室溫で行つた。

ホルモンを注射した個体の卵巣に起る變化をしらべるために、注射後 1 時間毎に腹部の体壁を切り開いて、そのまま Gilson 氏液で固定し、卵巣のみを取り出して、10-15 ミクロンの切片にし、Heidenhain 氏ヘマトキシリントエオシンとで染色した。排卵後の卵も卵巣と同様に固定して切片を作り、同じヘマトキシリントエオシンで染色した。

観察と實驗

A 生殖腺：シマドジョウの繁殖期は 5 月と 6 月で、この期になると卵巣は 1 個の紡錘形の器官として大きく肥大し、体腔をふくらませる様になる。精巢は左右 1 対の膜片状の

*本研究は文部省科學研究費の一部によつて行われた。

細長い器官で、卵巢に比較してその容積は極めて小さい。卵巢の前端部は肝臓、胃等の内臓器官の間から始まり、急に太くなつて後方に走り、腹鰓の附着する附近から次第に細くなり、最後に短い輸卵管となる。これは總排泄腔の中から突出する短い突起を通り、その先端にある生殖孔から外界に開く。

B ホルモン注射による卵巢の變化

1) 實驗: この實驗に使用した雌はすべてで 55 尾であつた。そのうち福山市附近で採集したものは 32 尾で、それらの全長(吻端から尾の先端まで)は 46-79 mm、多くは 57-70 mm であつた。残り 23 尾は鳥取原産のものを卵から飼育して成熟せしめた個体で、全長は 50-55 mm であつた。脳下垂体懸濁液は 0.1 cc の Ringer 氏液中にトノサマガエルの脳下垂体 8 個を含む様に調製して、これを全長 55 mm 以下のものには 0.025 cc ずつ、それより大形のものには 0.05 cc ずつを注射した。しかし 75 mm 以上の特に大形のものには 0.075 cc ずつ注射した。注射部位は腹部の任意の位置で、ただ腸管が走る正中線上をよけて行い、腹腔内にできるだけ浅く注入した。

スジシマドジョウに對するホルモン注射の効果は、魚が弱つていない限り確實であつて、實驗中何等の効果も示さなかつた個体は 1 尾もいなかつた。ただ卵巢内の全卵が完全に反応するとは限らないで、若干が未熟のままで卵巢内に殘る場合や、或いは胚胞を有する狀態の卵が若干まじつて排卵されることがあつた。しかし採集して間のない個体ではこの様なことは少いし、殊に卵から飼育して成熟せしめたものは、實驗中、環境の變化による影響が少いためか、卵巢は小形の卵母細胞を除いて全卵が一様に反応し、未熟のままで殘る卵は極めて少い。

表 1 ホルモン注射による体内卵巢の變化

注射後の時間	腹部壓迫による產卵	卵巢の外觀	卵の状態
1	卵を出さない	白色	變化なし
2	同上	白色	胚胞周圍の卵黃粒溶解
3	同上	白色	胚胞動物極へ移動
4	同上	少し透明*	胚胞消失の途中
5	同上	半ば透明	胚胞消失。卵黃粒癒合
6	同上	殆んど透明	第1回成熟分裂
7	透明卵を出し始める	殆んど透明	第2回成熟分裂中期
8	透明卵を出す	透明	同上
9	同上	透明	同上
10	同上	透明	同上
11	同上	透明	同上

*「透明」といふ語は正常の成熟卵が有する透明度を指す。

25°C に於いて注射後 1 時間毎に開腹して観察した卵巢の状態と、それの固定後、切片によつて観察した結果は第 1 表に示す如くである。ただしこれは多くの個体の卵巢及び同一卵巢内の多くの卵に於いて見られる状態を示すものであつて、個体によつても卵によつても、ホルモンの刺戟に對する反応に多少の遅速がある。

2) 切片による観察

a) 未熟卵：卵巣内にある卵は球形ではなく、互に押し合つて幾分多面体となつてゐる(第1圖)。卵は薄い濾胞膜に包まれてゐるが、その直徑は固定したもので 0.7 mm 内外である。濾胞膜は内外 2 層よりなり、その内層にはヘマトキシリソでよく染まる微細な顆粒が 1 平面に並んでゐる。又濾胞膜の所々に扁平になつた核が観察される。濾胞膜の内側には卵の表面を包む均一質の卵膜が密接する。この 1 ケ所に漏斗状に陥入した受精孔が観察される。受精孔が位置する附近の卵膜は他の部分よりも多少厚いし、又ヘマトキシリソで染まり易いので、これを發見することは甚だ容易である。

卵の細胞質は一様に分布した卵黄粒で満たされている。卵黄粒は比較的小さく、最も大なるもので徑約 10 ミクロンである。細胞質の大部分はこの大きさに近い顆粒で占められ、それらの間や、卵表面に近い部分が更に小形の卵黄粒で満たされている。胚胞はほぼ 130-150 ミクロンの徑を有し、卵の中央附近に位置するが、必ずしも受精孔に近い側とは限らず、遠い側にあることもある。胚胞の中にはヘマトキシリソで染色される多數の顆粒が含まれてゐる。

b) 胚胞の消失

注射後 1 時間経過したものでは未だ卵巣に何の變化も観察されないが、2 時間経過したものでは胚胞の周圍にある卵黄粒が溶解して、そこに細胞質が集まつてゐる。元來、卵黄粒はヘマトキシリソで濃染するが、溶解を始めると、これでは染まらないでエオシンでよく染まる様になる。始めは顆粒の形が保たれてゐるが、次第に崩れて細胞質に同化する。この様な變化は胚胞の周圍から遠方へ多少ひろがるが、受精孔に向つて特にこれが著しい。發生の進んだ卵では胚胞が既に受精孔の近くに位置し、その形も不規則となり、胚胞の附近一帯にある卵黄粒は殆んど溶解し、ことに卵表面に沿うて溶解區域がひろがり、卵表面近くの所々に均一質の液胞が形成せらるべきである(圖 2)。3 時間後になると多くの卵に於いて胚胞は動物極へ移動し、その附近に細胞質が集積しているが、この頃までは胚胞の附近以外の卵黄粒はあまり影響を受けていない。4 時間後の卵では胚胞が消失し始めると共に、全卵の卵黄粒が影響を受ける。即ち胚胞の附近にあるものは溶解して細胞質に同化されるが、その他のものは數個ずつが癒合し始める。5 時間後の卵に於ては多くは胚胞が既に全く消失し、又卵黄粒の癒合が進行して、大なるものは徑約 18 ミクロンとなる。胚胞や卵黄粒がこの状態に達すると、卵は所謂透明卵となる。

c) 成熟分裂：多くは受精後 6 時間

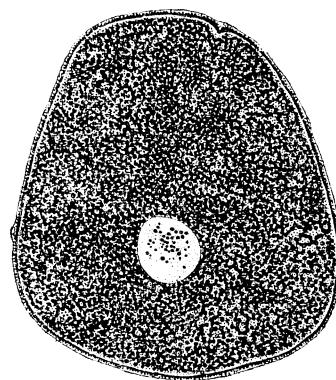


圖 1 ホルモンの注射後 1 時間目の卵. ×67.

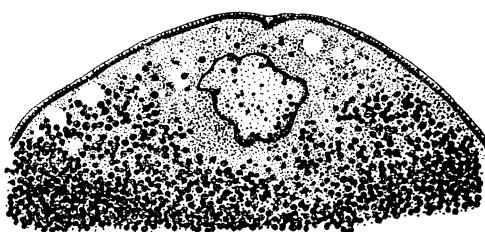


圖 2 ホルモンの注射後 2 時間目の卵. 卵黄粒の溶解と胚胞の移動を示す. ×100.

の卵に於いて第1回成熟分裂の紡錘が見られる。しかし中には受精後5時間で既に第2回成熟分裂の中期分裂像が見られるものがある。又卵によつては受精後7時間のものに第1回の分裂像が見られる。第1回分裂の紡錘は胚胞が消失した位置に形成せられるので、最初は卵の表面から少し離れた所に位置しているが、次第に表面に近づき、紡錘の方向も卵

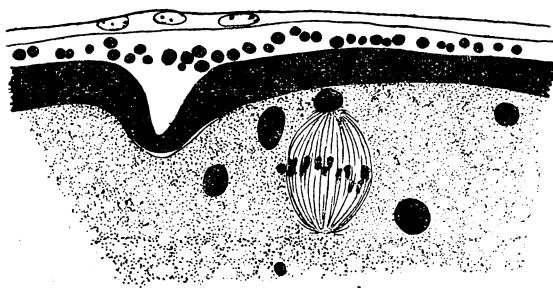


図3 ホルモンの注射後7時間目の卵。第1回成熟分裂を示す。× 930.

の表面に垂直になる(圖3)。この分裂像は常に受精孔の附近に位置するが、それの直下に位することは寧ろ稀で、多くの場合多少離れた所に見られる。第1回分裂によつて第1極体が形成せられると、卵内に残つた染色体を中心として、直ちに第2回成熟分裂の紡錘が形成せられる(圖4)。この紡錘が観察されるのは多くは受精後7時間の卵であつて、これは第1回分裂

の紡錘に比較すると遙かに小さいので、後者から容易に識別される。第2回分裂の紡錘は最初卵表面から少し離れた位置に形成せられ、間もなく中期の分裂像となつて、その外極が卵表面に接する様になる。卵の成熟がこの時期に達すると、濾胞膜が破れて排卵が起る。そして卵が水中に出されない限り、分裂像はこの状態のままで休止している(圖5)。

d) 産卵後の変化：排卵された卵をしづり出して人工受精を行い、水中に入れると、卵膜が急速に卵表面から離れ、廣い圍卵腔ができる。約21°Cに於て、受精後1.2分を経て卵膜が卵表面から離ればじめた卵を切片によつて観察すると、分裂中期で休止していた

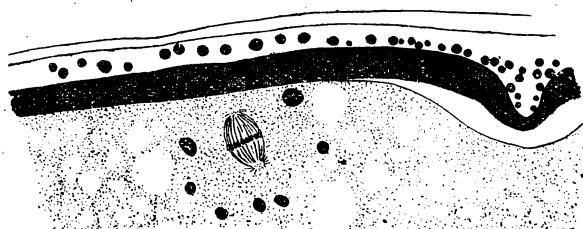


図4 ホルモンの注射後7時間目の卵。第2回成熟分裂を示す。× 930.

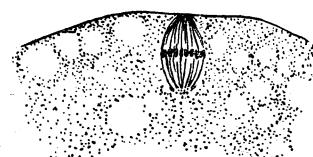


図5 ホルモンの注射後10時間目の卵。第2回成熟分裂が中期の状態で休止する。× 1240.

第2回成熟分裂は活動を開始して後期の分裂像となり、外極が卵表面から突出して、第2極体の形成途中であることがわかる(圖6)。受精後10分を経た卵では第2極体が既に放出され、卵内には卵表面からかなり離れた所に雌核と雄核とが相接近しているのが見られる(圖7)。受精後15分経過した卵では、雌雄兩核が融合して卵割核を作り、その周囲にかすかな星状体が形成せられている。20分後には星状体が兩極にわかれ、卵割核は分裂

前期の状態である。30分後の卵は第1回卵割の中期分裂像を示し、兩星（amphiaster）が大きく発達している（図8）。

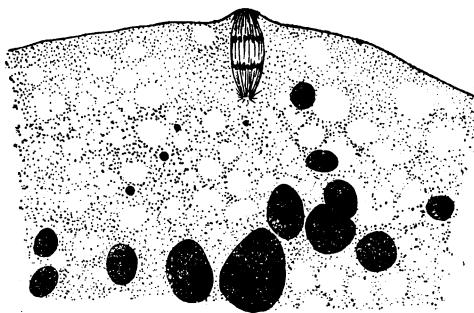


図6 受精直後の卵。第2回成熟分裂が後期となる。×930。



図7 受精後10分を経た卵。雌核と雄核とが相接近する。×930。

排卵された卵を水中にしづり出して、未受精のままに放置すると、この卵は少くとも雌核が形成せられるまでは受精卵に於けると同様の行動をする。即ち、水中に入れられると

同時に第2回成熟分裂が進行を始めて第2極体を放出し、10分後には卵表面からかなり離れた所に雌核を形成する（図9）。水中に入れて30分後の卵には單星（monaster）が形成せられたものも見られるが（図10）、かかるものはむしろ稀で、大多數のものに於ては核の分裂活動が観察されない。

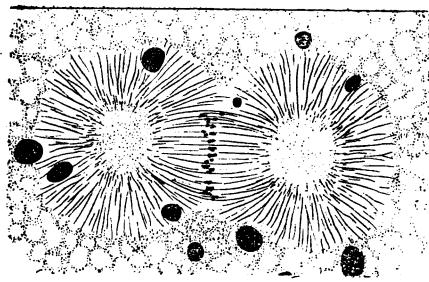


図8 受精後30分を経た卵。第1回卵割の中期を示す。×620。

C 硝子器内の卵巣片に対するホルモンの影響

Ringer 又は Holtfreter 氏液 1cc 中に含まれるトノサマガエルの脳下垂体前葉の数を $4 \cdot 2 \cdot 1 \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{8}$ 及び $\frac{1}{16}$ にした懸濁液を作り、その 2cc 中に 36—60 個の卵からなる卵巣片を入れて、その変化を観察した。25°C に於ける 1 實驗例では、4 個の脳下垂体を含む Ringer 氏液の中に浸してから 5 時間後に卵巣片の若干の卵がやや透明となり、7 時間後にはその透明度が頂點に達した。8 時間後には濾胞膜が破れて卵と卵との連絡がゆるみ、10 時間後には卵巣片をゆるく動かすことによつて、少數の卵が卵巣から離れる様になつた。11 時間目に數えた所では、43 個の卵の中で透明卵となつたのは 17 個で、そのうち 7 個が排卵された。この 7 個のうち、4 個を人工受精した所、2 個が受精して分裂したが、そのうちの 1 個は規則正しく分裂して 4 割球となつた。この卵を固定して、切片に

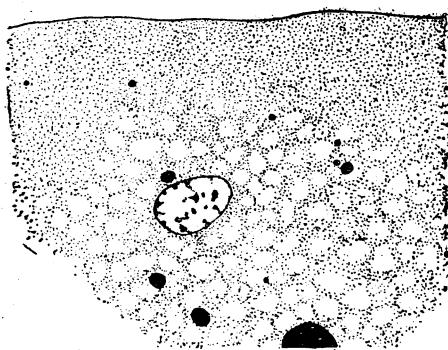


圖9 水中に入れて10分を経た未受精卵。雌核の形成を示す。 $\times 930$ 。

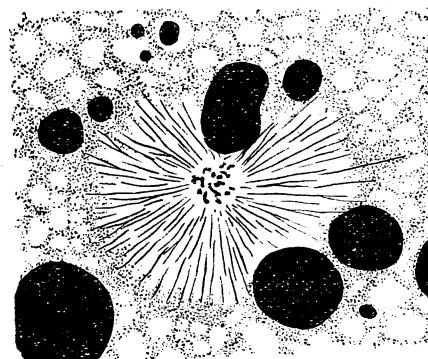


圖10 水中に入れて30分を経た未受精卵。單星の形成を示す。 $\times 930$ 。

よつて観察した所、明らかに正常の核分裂を示していた。1ccのRinger氏液中に含まれる脳下垂体が1個より少いものも、 $\frac{1}{8}$ 個以上であれば8時間後には卵と卵との連絡がゆるみ、10時間後には若干の卵が透明卵となつた。 $\frac{1}{16}$ 個を含むものに於ても、ごく少數ではあるが透明卵を生じた。

兩棲類に於て硝子器内の卵巣片がホルモンの刺戟によつて排卵するか否かは異論のある問題であつて、Wright ('45) 等はこれが起ることを主張し、Samartino と Rugh ('45) はそれが單に組織の退化によるもので、眞の排卵は起らないと言つている。シマドジョウに於ては、この様にして排卵された卵が少くとも正常な初期卵割をするから、眞の排卵であることは間違いない様に考えられる。

總 括

- 1) シマドジョウの腹腔内にトノサマガエルの脳下垂体前葉の懸濁液を注射し、卵巣に起る變化を主として切片によつて調べた。
- 2) 25°C に於て注射後2時間で胚胞の周囲にある卵黄粒が溶解する。多くの卵に於ては3時間後に胚胞が動物極へ移動し、5時間後にこれが消失、又卵黄粒が數個ずつ癒合し、卵は所謂透明卵となる。6時間後に第1回成熟分裂が起り、7時間後に第2回成熟分裂の中期に達する。この頃から排卵が始まる。
- 3) 水中に出された卵は、受精しなくとも第2回成熟分裂が受精卵の如く進行して、第2極体を放出し、雌核を形成する。
- 4) 卵巣片を脳下垂体前葉の懸濁液に入れると、排卵が起る。この様にして得た卵は人工受精によつて少くとも正常の初期卵割をすることができる。

文 献

- Houssay, B. A. 1931: Action sexuelle de l'hypophyse sur les Poissons et les Reptiles. C. R. Soc. Biol. Paris, 106: 377-378.
- 川村智治郎 1944: 魚類放養の基礎的研究
— 1947: ホルモンによる魚類の産卵促進。生理生態、1(2): 125-134。
- Samártino, 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.

Résumé

On Artificial Ovulation in the Spinous Loach.

1. Changes occurring in the ovarian eggs of the spinous loaches which were injected with frog pituitary suspension during the breeding season were observed microscopically on sections of fixed material.

At 25°C the changes found in most of the eggs were as follows:

Yolk granules surrounding the germinal vesicle begin to dissolve two hours after the injection. The germinal vesicle is moved towards the animal pole one hour later. At the fifth hour after the injection it disappears and all of the yolk granules contained in the egg show a tendency to become larger by fusion with neighboring ones. At that time the eggs begin to become semi-transparent.

The first maturation spindle is observed in the eggs which were fixed six hours after the injection. The metaphase spindle of the second maturation division is formed one hour later. About that time ovulation begins to occur in the spinous loaches.

2. The unfertilized egg shed into water gives off the second polar body and forms the female pronucleus in the egg as the fertilized does.

3. When fragments of the ovaries of spinous loaches are immersed in frog pituitary suspension in vitro, ovulation occurs. One of the eggs extruded from the fragments cleaved normally after insemination.